

Aus der Klinik für Innere Medizin,
Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Immunologie
Direktor: Prof. Dr. Andreas Neubauer
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Genomweite funktionelle Analyse von p53-Bindungsstellen via ChIPseq



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Humanmedizin,
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Charlotte Heyl, geb. Schaaf
aus Bonn

Marburg, 2015

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg am: 21. Juli 2015

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Herr Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Herr Prof. Dr. T Stiewe

1. Korreferent: Herr Prof. Dr. K.-H. Grzeschik

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	6
Summary	6
1. Einleitung	11
1.1 Krebserkrankungen - eine kurze Übersicht	11
1.2 p53 - Wächter des Genoms	13
1.2.1 DNA-Bindungsmotiv, Proteinstruktur und Bindungskoopertivität	15
1.2.2 Aktivierung, Regulation und Zielgenselektion	20
1.2.3 p53 und Krebs	23
1.3 Zielsetzung dieser Arbeit	26
2. Material und Methoden	29
2.1 Materialien	29
2.1.1 Lösungen, Puffer und Medien	29
2.1.2 Allgemeine Puffer und Lösungen	29
2.1.3 Enzyme und allgemeine Biomoleküle	33
2.1.4 Zelllinien	33
2.1.5 Adenoviren	33
2.1.6 Antikörper	33
2.1.7 Größenmarker	34
2.1.8 Oligonukleotide	35
2.1.9 Laborgeräte, Materialien und Kits	37
2.2 Methoden	40
2.2.1 Zellkultur	40
2.2.2 Western Blot	41

2.2.3	Chromatin-ImmunoPräzipitation	42
2.2.4	Quantitative realtime-PCR (qPCR)	43
2.2.5	Sequenzierung	44
2.2.6	Datenanalyse	45
2.2.7	De Novo Motivsuche	47
2.2.8	ROC-Kurven	47
2.2.9	Funktionelle Analyse des Zielgenspektrums	48
3.	Ergebnisse	49
3.1	Genomweite funktionelle Analyse von p53-Bindungsstellen via ChIPseq	49
3.1.1	Die Anzahl der BS und damit der direkten Zielgene steigt mit zunehmender Kooperativität	56
3.1.2	Die Kooperativität beeinflusst die Bindung an das p53-Motiv . .	62
3.1.3	Die Kooperativität hat Einfluß auf das Zielgenspektrum	68
3.2	Die p53-Kooperativität ist entscheidend für die Genexpression	73
4.	Diskussion	81
4.1	Kooperativität, Zielgenentscheidung und Zielgenexpression	82
4.2	„Doppelt hält besser“ - spezifische und unspezifische DNA-Bindung . .	86
4.3	P53 - Hoffnungsträger der Tumorthherapie	88
4.4	Grenzen und Ausblick dieser Arbeit	92
5.	Literaturverzeichnis	95
6.	Anhang	109
6.1	Ergänzende Daten	109
6.2	Abkürzungen	119
6.3	Lebenslauf	122
6.4	Verzeichnis der akademischen Lehrer	123
6.5	Danksagung	124
6.6	Ehrenwörtliche Erklärung	125

Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor p53 ist einer der wichtigsten humanen Tumorsuppressoren und reguliert die Expression von Genen insbesondere im Bereich von Apoptose, DNA-Reparatur, sowie Zellzyklusarrest. Häufig wird p53 daher auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet. Die zentrale Rolle von p53 in der Verhinderung der Tumorentstehung wird daran deutlich, dass es in etwa der Hälfte aller menschlichen Tumoren mutiert vorliegt. Besonders häufig finden sich diese Mutationen im Bereich der zentralen DNA-Bindungsdomäne. In erster Linie führt die Aktivierung von p53 durch zellulären Stress, wie etwa Hypoxie, DNA-Schädigung oder Onkogenaktivierung, abhängig von Ausmaß und Dauer der Schädigung oder des Reizes zu Zellzyklusarrest und DNA-Reparatur oder aber zum Tod der Zelle durch Apoptose. Wie p53 jedoch im Einzelnen diese Entscheidung trifft und unterschiedliche Gruppen von Zielgenen aktiviert, ist unklar. Die Daten der vorliegenden Arbeit belegen, dass der DNA-Bindungs Kooperativität von p53 bei diesen Prozessen eine entscheidende Rolle zukommt.

In dieser Arbeit wurde mithilfe der ChIPseq-Methodik die DNA-Bindung von p53 genomweit untersucht. Erstmals wurden neben p53-Wildtyp weitere p53-Mutanten unterschiedlicher DNA-Bindungs Kooperativität hinsichtlich der Eigenschaften ihrer Bindungsstellen und der Zielgenselektion miteinander verglichen. Dabei lag ein besonderes Augenmerk der funktionellen Analyse auf apoptotischen Zielgenen, sowie Genen aus den Bereichen Zellzyklusarrest und DNA-Reparatur. Die Daten dieser Arbeit belegen, dass für die Bindung und Aktivierung apoptotischer Zielgene eine vergleichsweise hohe DNA-Bindungs Kooperativität notwendig ist, während Gene aus den Bereichen Zellzyklusarrest und DNA-Reparatur häufig auch von deutlich schwächer kooperativem p53 gebunden und aktiviert werden. Eine eingesetzte p53-Mutante mit sehr stark eingeschränkter Kooperativität zeigte im Wesentlichen keine Bindung und

Zielgenaktivierung.

In Zeiten der „targeted therapy“ ist ein Protein, das bei fast allen Krebspatienten in seiner Funktion beeinträchtigt ist, ein vielversprechender Kandidat zukünftiger Krebstherapien. Berücksichtigt man die Häufigkeit der kooperativitätsbeeinträchtigenden Mutationen der p53-DNA-Bindungsdomäne, ist die Wiederherstellung der Kooperativität von p53 ein lohnender Ansatzpunkt. Die vorliegende Arbeit kann somit zu einem besseren Verständnis der Bedeutung und Auswirkung der DNA-Bindungskooperativität von p53 und deren therapeutischen Anwendung beitragen.

Summary

The transcription factor p53 is one of the most important human tumor suppressors and regulates expression of genes especially in the fields of apoptosis, DNA-repair and cell cycle arrest. Therefore it is regularly described as „guardian of the genome“ . Its central role in suppression of tumor development becomes apparent considering the fact that it is mutated in about half of all human tumors. Very often those mutations lie in the region of the central DNA binding domain. First of all activation of p53 by cellular stress, e.g. hypoxia, DNA-damage or activation of oncogenes, leads (depending on the extent and duration of damage or stimulus) to either cell cycle arrest and DNA-repair or the destruction of the cell by apoptosis. How p53 makes this decision in detail and activates different sets of target genes, is unclear though. The data of this thesis prove that DNA binding cooperativity plays a vital role in these processes.

In this thesis genomwide DNA-binding of p53 was examined via the ChIPseq method. For the first time p53-wildtype and p53-mutants with variable DNA-binding cooperativity were compared concerning the properties of their binding sites and target gene selection. For the functional analysis a particular focus was on apoptotic genes and genes from the fields of cell cycle arrest and DNA-repair. The data in this thesis prove that a rather high DNA-binding cooperativity is necessary for binding and activation of apoptotic target genes, whereas cell cycle arrest- and DNA-repair genes are often bound and activated even by less cooperative p53. One p53-mutant with excessively impaired DNA-binding cooperativity did not show significant binding and activation of gene expression.

In times of „targeted therapy“ a protein that is impaired in its function in about half of all cancer patients is a promising candidate for future cancer therapies. Considering the frequency of mutations in the DNA-binding domain of p53, restoration of p53-cooperativity is a promising target. This thesis can therefore make a contribution to

understanding the importance and consequences of DNA-binding cooperativity and to their therapeutical application.

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Krebserkrankungen - eine kurze Übersicht

Krebserkrankungen gehören zu den häufigsten Todesursachen in Deutschland und weltweit. So beträgt nach Angaben der GEKID (Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister e.V.) das Lebenszeitrisko an Krebs zu erkranken derzeit für Männer 50,7 % und für Frauen 42,8 %. Nach Daten des Statistischen Bundesamtes aus dem Jahre 2010, waren „Neubildungen“ mit 218 889 Todesfällen (25,5 % aller Todesfälle) nach Krankheiten des Kreislaufsystems die zweithäufigste Todesursache - im mittleren Lebensalter sogar die häufigste Ursache.

Die altersstandardisierte Anzahl der jährlichen Krebsneuerkrankungen liegt nach Angaben der GEKID seit einigen Jahren relativ konstant bei etwa 450/100 000 für Männer und 350/100 000 für Frauen, die altersstandardisierte Steberate hingegen hat sich zwischen 1999 und 2008 stetig verringert. Dennoch liegt das Risiko bei Diagnose einer Krebserkrankung an dieser zu versterben nach wie vor bei rund 50 %, wobei die Mortalität im Einzelfall sehr von Art, Stadium und Metastasierung der Krebserkrankung abhängig ist.

Mit „Krebserkrankung“ wird umgangssprachlich eine maligne Neoplasie bezeichnet, die grundsätzlich jede Art von Körpergewebe betreffen kann und bei der das Gleichgewicht zwischen Zelltod und Zellvermehrung zugunsten der Proliferation gestört ist.

Ursächlich für dieses Ungleichgewicht sind Mutationen der DNA. Eine große Anzahl unterschiedlicher Faktoren kann zu Veränderungen der DNA führen: neben „Ablesefehlern“ bei der DNA-Replikation sowohl Noxen wie Röntgen- oder UV-Strahlung,

chemische Substanzen die beim Rauchen entstehen oder über die Nahrung aufgenommen werden, eine Reihe von bakteriellen oder häufiger noch viralen Infektionen oder auch vererbte Mutationen bestimmter Gene. Die entstandenen Defekte werden üblicherweise direkt behoben. Bleiben diese Korrekturen jedoch aus oder werden sie nur unvollständig durchgeführt, können wichtige Gene nur fehlerhaft oder gar nicht abgelesen werden und die Zellhomöostase wird gestört.

Veränderte Gene, die zur Krebsentstehung führen können, lassen sich in zwei Untergruppen unterteilen: Protoonkogene und Tumorsuppressorgene (Grandér et al., 1998). Protoonkogene erlangen durch DNA-Mutation zusätzliche Funktionen, die zur Tumorentstehung beitragen. Häufig sind dies Gene, deren Proteine Zellwachstum und -proliferation begünstigen. Ein prominentes Beispiel für diesen Mechanismus ist beispielsweise das kleine G-Protein RAS, das in mehr als 20 % menschlicher Tumore, überwiegend durch eine Punktmutation, verändert vorliegt (Bos et al., 1989). Tumorsuppressorgene hingegen sind Gene, deren Mutation zu einem Funktionsverlust führt, der die Krebsentstehung begünstigt. In diese Gruppe finden sich häufig Gene, durch deren Expression Zellwachstum und Proliferation unterdrückt und kontrolliert werden. Ein typischer Vertreter dieser Gengruppe ist das Retinoblastomgen Rb, bei dem die Deaktivierung beider Allele (in der Regel ist die Mutation eines der beiden Allele ererbt) zu dem Krankheitsbild des kindlichen Retinoblastoms führt (Berger et al., 2011). Eine Reihe von Mutationen müssen die Schutzmechanismen einer Körperzelle außer Kraft setzen um zu der unkontrollierten Proliferation und damit zu der Entstehung einer Tumorerkrankung beizutragen. Kommt es neben der alleinigen Zellproliferation darüber hinaus auch zur Invasion in umliegendes gesundes Gewebe oder gar zu Fernmetastasen, liegt eine maligne Krebserkrankung vor (Hanahan et Weinberg, 2000).

So vielfältig sich Krebserkrankungen darstellen, so unterschiedlich sind auch die Therapiekonzepte, die allgemein auf den Säulen „operative Therapie“, „Bestrahlung“ und „medikamentöse Therapie“ aufgebaut sind. Vor allem im Bereich der medikamentösen Therapie gibt es ein weites Spektrum an Substanzen und Wirkweisen, das sich stetig erweitert. Eine wichtige Entwicklung der jüngeren Vergangenheit ist etwa die Einführung sogenannter „targeted therapies“, die gezielt auf biologische und zytologische Eigenschaften des Tumorgewebes abgestimmt sind. Dazu gehören beispielsweise monoklonale Antikörper, wie der gentechnisch hergestellte Antikörper Rituximab gegen

CD20, das an der Oberfläche von über 90 % der B-Zell-Lymphome exprimiert wird (McLaughlin et al., 1998), oder sogenannte „small molecules“, wie der Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib (Buchdunger et al., 1996), die gezielt in die Signaltransduktion von Krebszellen eingreifen. Diese neuen Therapiekonzepte verbessern nicht nur die Prognose der betroffenen Patienten zum Teil drastisch, sondern sind zudem durch ihren spezifischen Wirkmechanismus auf die Krebszellen häufig erheblich nebenwirkungsärmer als herkömmliche Chemotherapeutika.

1.2 p53 - Wächter des Genoms

Das Protein p53 wurde vor gut 35 Jahren, 1979, durch mehrere Gruppen unabhängig voneinander zunächst in Tumorzellen entdeckt. Das zugehörige Gen *TP53* ist das am häufigsten veränderte Gen in humanen Krebszellen und mit knapp 75.000 Pubmedeinträgen (Januar 2015) darüber hinaus eines der am intensivsten untersuchten.

Die Funktion von p53 für die Tumorsuppression sowie für weitere Aspekte des Zellstoffwechsels ist überaus komplex und erst teilweise bekannt und verstanden. Klar ist, dass p53 in erster Linie als Transkriptionsfaktor die Expression einer großen Bandbreite an Genen reguliert (Vousden et Prives, 2009). Seine Hauptfunktion, aufgrund der p53 häufig auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet wird (Lane et al., 1992), ist die eines Tumorsuppressors, der als Schnittstelle im Zentrum eines komplexen Netzwerkes aus vielfältigen Signalwegen steht (siehe Abb. 1.1).

Sowohl der Pfad der p53-Aktivierung als auch die resultierende Reaktion ist abhängig von einer Vielzahl an Faktoren - der Art und Dauer des auslösenden Stimulus, dem Ausmaß des entstandenen Schadens, des Gewebetyps und einer Vielzahl anderer Faktoren, die nicht alle vollständig bekannt sind.

Gerät eine Zelle, beispielsweise durch Hypoxie, DNA-Schädigung oder der Expression von Onkogenen, in einen Streßzustand, kommt es über die Aktivierung von p53 zu einer Palette von möglichen Reaktionen. Diese variablen Signalwege mit unterschiedlichem Resultat für die Zelle erlauben neben einer flexiblen Reaktion auf Streßsignale auch eine Absicherung der wichtigen tumorsuppressiven Funktion von p53. So erfolgt im Falle eines eher milden Schadens oder Reizes die Blockade des Zellzykluses in der G1-Phase via p21, sowie über weitere, durch p53 hochregulierte Proteine, wie etwa

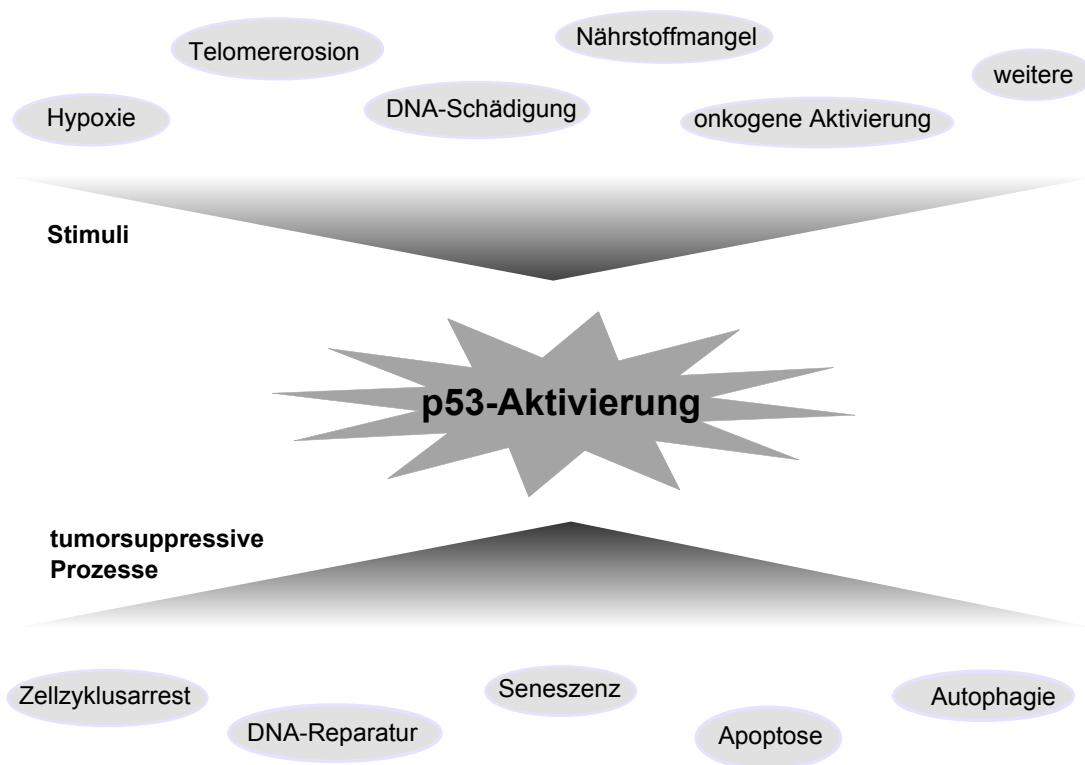


Fig. 1.1: Eine Vielzahl auslösender Stimuli, wie DNA-Schädigung, Hypoxie, aktivierte Onkogene und andere können zu der Aktivierung von p53 und zu sehr unterschiedlichen tumorsuppressiven Reaktionen führen (nach Vogelstein et al., 2000; Vousden et Lane, 2007).

14-3-3-sigma oder GADD45 (El-Deiry et al., 1998). Dies gibt der Zelle die Möglichkeit, die entstandenen Schäden zu reparieren. Alternativ kann bei unzureichender Reparatur, onkogener Aktivierung oder telomerer Dysfunktion die Zelle unter Beteiligung der Proteine p21 und PAI1 in einen Zustand dauerhaften Zellzyklusarrestes, die Seneszenz, versetzt werden. Durch diesen Mechanismus kann Tumorprogression effektiv verhindert werden (Serrano et al., 1997; Deng et al., 2008, Halazonetis et al., 2008).

Über gänzlich andere Zielgene hingegen kann p53 alternativ aber auch zum Zelltod, der Apoptose, führen. Schon frühe Studien konnten zeigen, dass Wildtyp-p53 an den *BAX*-Genpromotor binden und dessen Transkription regulieren kann (Miyashita et al., 1994; Miyashita et al, 1995). *BAX* ist ein Mitglied der Bcl-2-Familie, die eine wichtige Rolle für Apoptose und die Tumorsuppression spielt und deren Mitglieder sowohl pro- als auch antiapoptotische Wirkung besitzen können. So kontrolliert BCL-2 die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien, welches über die Aktivierung der Caspase 9 eine wichtige Rolle in der Auslösung der Apoptose spielt (Cotter et al., 2009;

Yip et al., 2008). Neben diesen mitochondrialen Apoptosesignalwegen spielt p53 auch bei der Auslösung der Apoptose über FAS (auch CD95 oder APO-1 genannt) eine Rolle (Muller et al., 1997; Muller et al., 1998). Weiterhin ist p53 ein Transkriptionsfaktor für einige Proteine einer BCL-2-Subfamilie, so zum Beispiel für PUMA und NOXA, welche beide Schlüsselstellungen in durch p53 regulierten Apoptosesignalwegen einnehmen (Nakano et al., 2001; Yu and Zhang, 2003; Oda et al., 2000).

Neben diesen klar tumorsuppressiven Effekten kann p53 jedoch noch eine Reihe von weiteren möglichen Reaktionen auslösen, die teilweise einen genau gegenläufigen Effekt haben. So trägt p53, auf den ersten Blick paradoxerweise, zum Zellüberleben bei, indem es über eine Reihe von Proteinen die Apoptose inhibieren kann. Dies umfasst etwa p21, den PUMA-supprimierenden Transkriptionsfaktor SLUG, sowie Aktivatoren des AKT/PKB-Signalweges (Janicke et al., 2008). Sinnvoll ist dieser Mechanismus im Kontext der DNA-Reperatur, zu der die Aktivierung von p53 auf vielfältige Art und Weise beitragen kann (Gatz and Wiesmuller, 2006; Vousden et Prives, 2009). Vousden und Prives, 2009 postulieren ein Model, das den dualen Mechanismus von p53 in Tumorzellen erklärt (siehe Abb. 1.4). Demzufolge kann p53 entweder bei niedrigem Stress und geringen Schäden zellprotektive Funktionen (Zellzyklusarrest, Inhibition des Zellwachstums, Regulation des Metabolismus, DNA-Reparatur, sowie Antioxidans) erfüllen als auch bei höherem Stresslevel und irreparablen Schäden als „Zellkiller“ (Apoptose, Prooxidans) wirken.

1.2.1 DNA-Bindungsmotiv, Proteinstruktur und Bindungskoopерativität

Wichtig für die Funktion des Proteins p53 als Transkriptionsfaktor ist seine Fähigkeit sequenzspezifisch sogenannte responsive Elemente (REs) der DNA zu binden (Cho et al., 1994). In den neunziger Jahren gelang es die Sequenz solcher REs von p53 zu identifizieren: zwei decamere Sequenzen (sogenannte „Halfsites“), bestehend aus 5-RRRCWWGYYY-3 (R = A,G; W = A,T; Y = C,T) formen das Vollmotiv („Fullsite“) der p53-Konsensussequenz (Kern et al., 1991; el-Deiry et al., 1992; Funk et al., 1992). Die beiden Halfsites können durch einen Spacer variabler Länge voneinander getrennt sein (üblicherweise 0 bis 13 bp) (Tokino et al., 1994; Harris et al., 2009). Aktuelle

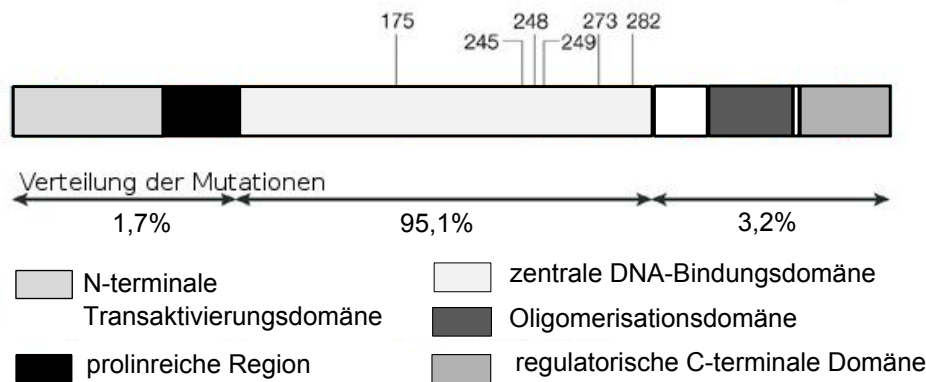


Fig. 1.2: Ein p53-Molekül besteht aus verschiedenen Domänen mit jeweils spezifischen Funktionen, wie der Transaktivierung, der sequenzspezifischen DNA-Bindung und der Oligomerisation. Der Großteil der Punktmutationen in Krebszellen findet sich im Bereich der sehr konservierten zentralen DNA-Bindungsdomäne. Markiert sind weiterhin sechs Mutations„hotspots“ im Bereich der DNA-Bindungsdomäne, an denen sich allein knapp 30 % der Mutationen finden. Die Zahlen stehen für die jeweiligen Aminosäurenummern (nach Vousden et Lu, 2002).

Studien zeigen allerdings durch Methoden wie ChIP-on-chip oder ChIP-PET, dass p53 in vivo überwiegend an decamere Bindungsstellen (BS) ohne Spacer bindet (Smeenk et al., 2008; Wei et al., 2006). Die Konfiguration der p53-Konsensussequenz ist also insgesamt sehr konserviert, kann allerdings an einzelnen Promotoren durchaus variieren (Ma et al., 2007).

Ein p53-Molekül besteht aus verschiedenen Domänen mit jeweils spezifischen Funktionen (siehe Abb. 1.2). Eine N-terminale Transaktivierungsdomäne (TAD; 1 - 62) interagiert mit diversen regulatorischen Proteinen, wie beispielsweise MDM2 (Honda et al., 1997; Marine et al., 2006). Die anschließende prolinreiche Region (63-94) enthält ein SH3-Domänen-Bindungsmotiv und hat vermutlich regulatorische Funktion (Walker et Levine, 1996; Müller-Tiemann et al., 1998). Die zentrale sequenzspezifischen DNA-Bindungsdomäne (DBD; 94 - 292) bindet spezifisch an oben beschriebene REs doppelsträngiger DNA (el-Deiry et al., 1992). Schließlich dient eine C-terminale Oligomerisationsdomäne (324-355) der Oligomerisation von p53, sowie eine regulatorische C-terminale Domäne (361-393) der Regulation und der sequenzunabhängigen Bindung an die DNA (Prives et Manley, 2001; Weinberg et al., 2004a). Dieses doppelte Vorliegen von DNA-Bindungsdomänen, spezifisch für die p53-Konsensussequenz im zentralen Anteil des Proteins, unspezifisch im Bereich des C-Terminus, ist eine Besonderheit

des Transkriptionsfaktors p53. Beide Anteile können miteinander interagieren, was zu einer Stabilisierung der spezifischen DNA-Bindung der zentralen Domäne durch die unspezifische C-terminale DNA-Bindungsdomäne führt (Cain et al., 2000; Espinosa et al., 2001; McKinney et al., 2002).

Sowohl N- als auch C-Terminus liegen strukturell üblicherweise intrinsisch ungeordnet vor (Bell et al., 2002; Weinberg et al., 2004a). Dies erleichtert die Interaktion mit einer großen Anzahl an verschiedenen Zielproteinen und stellt eine typische Eigenart von Proteinen an zentraler Stelle in Protein-Interaktionsnetzwerken dar (Dunker et al., 2005). Aber auch die zentrale DNA-Bindungsdomäne des p53-Proteins ist bei Körpertemperatur thermodynamisch und kinetisch kaum oder gar nicht stabil (Friedler et al., 2003; Butler et al., 2005). Neuere Analysen der DBD mithilfe der NMR-Spektroskopie von Canadillas et al., 2006, konnten ein großes Ausmaß struktureller Flexibilität im Bereich mehrerer Loops zeigen, häufig bedingt durch die Ausbildung von suboptimalen Wasserstoffbrückenbindungen. Vermutlich bedeutet diese intrinsische Instabilität des p53-Proteins einen evolutionären Vorteil durch eine bessere Bewältigung der komplexen und vielfältigen Funktionen. Gleichzeitig steigt jedoch auch die Anfälligkeit gegenüber destabilisierenden und inaktivierenden Mutationen (Joerger et al., 2007).

Kristallstrukturanalysen von p53 im Komplex mit Konsensussequenz-enthaltender DNA, durchgeführt von Cho et al. (1994) zeigten das Strukturgerüst der zentralen DBD: zwei antiparallele β -Faltblätter formen das Grundgerüst für zwei größere Loop-Strukturen, welche durch ein Zinkatom stabilisiert werden, sowie für ein Loop-Faltblatt-Helix-Motiv. Die Aminosäuren des Loop-Faltblatt-Helix-Motivs sowie eine der beiden Loops interagieren mit der DNA und bilden so gemeinsam die DNA-Bindungsfläche von p53. Sowohl die Loops als auch das Loop-Faltblatt-Helix-Motiv bestehen aus sehr konservierten Regionen und beinhalten einen Großteil der in Tumoren identifizierten p53-Mutationen.

Weitere biochemische und strukturelle Analysen (Kitayner et al., 2006; Ho et al., 2006; Malecka et al., 2009) konnten zeigen, wie zwei monomere DBDs in Kontakt mit der doppelsträngigen p53-Konsensussequenz an eine DNA-Halbsite binden und ein symmetrisches Dimer bilden. Zwei solcher Dimere, jedes an eine Halbsite der Konsensussequenz bindend, formen durch Proteininteraktionen ein Tetramer (siehe Abb. 1.3). Untersuchungen mittels analytischer Ultrazentrifugation und Fluoreszenza-

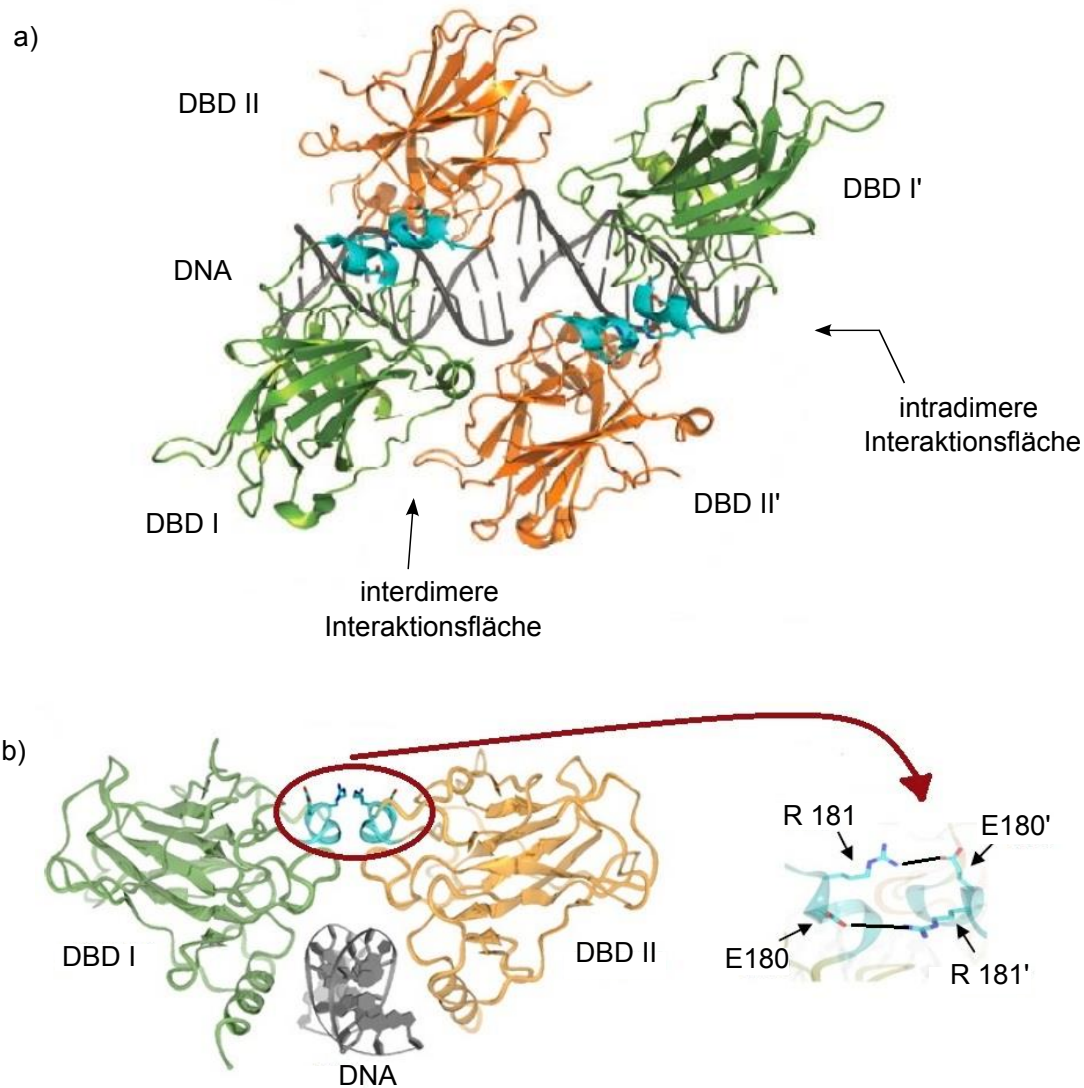


Fig. 1.3: Die Quartärstruktur von p53-DNA-Bindungsdomänen (DBDs) an der DNA (nach Kitayner et al., 2006; Schlereth et al., 2010a). Das p53-Tetramer kann als Dimer von Dimeren mit intradimeren sowie interdimeren Interaktionsflächen beschrieben werden (a); Ansicht von oben. In Vergrößerung zwei DBD-Monomere, welche über die beiden H1-Helices (hellblau) durch Ausbildung doppelter Salzbrücken (schwarz markiert) zwischen den gekennzeichneten Aminosäuren Glutamat (E180) und Arginin (R181) miteinander interagieren (b); Seitenansicht.

nisotropie ergaben, dass die spezifische Bindung an die DNA hochkooperativ ist, dass tetrameres p53 die DNA also stärker als zwei einzelne p53-Dimere oder vier nicht miteinander interagierende p53-Monomere bindet. Gleichzeitig begünstigt die Bindung eines p53-Dimers an die DNA die Bindung eines weiteren Dimers. Liegt p53 bei in-vitro-Untersuchungen überwiegend in seiner dimeren Form vor, so induziert der Kontakt mit der doppelsträngigen DNA-Konsensussequenz die Tetramerbildung (Weinberg et al., 2004b). Dabei beschränken sich die Interaktionsflächen innerhalb des Tetramers nicht auf die Oligomerisationsdomänen, sondern es kommt desweiteren zu sehr spezifischen Interaktionen im Bereich der H1-Helices der DBD. Eine Vielzahl von Kristallstrukturanalysen und Untersuchungen an gelösten p53-Molekülen (Ho et al., 2006; Kitayner et al., 2006; Klein et al., 2001, Rippin et al., 2002; Chen et al., 2010) bestätigen die Struktur der zentralen DBD eines an seine Konsensussequenz gebunden p53-Tetramers als Dimer von Dimeren, die je an eine Halfsite des palindromischen Vollmotivs binden. Die interdimere Bindung wird dabei durch eine große Anzahl von Wasserstoffbrückenbindungen, Van-der-Waals-Kräfte und durch geordnete Wassermoleküle vermittelt.

Im Gegensatz zu dieser relativ großen Anzahl an Bindungen an der interdimeren Fläche findet die Bindung an der intradimeren Berührungsfäche der dimerbildenden zwei Monomere ausschließlich im Bereich der H1-Helix, sowie der L2 und L3-Loops statt (Chen et al., 2010). Eine entscheidende Rolle kommt hierbei zwei gegensätzlich geladenen Aminosäuren, einem Glutamat in Position 180 (E180), sowie einem Arginin in Position (R181), im Bereich der üblicherweise sehr konservierten kleinen H1-Helix zu. Diese Aminosäuren bilden zwei intermolekulare Salzbrücken aus, die entscheidend für die Stabilität und DNA-Bindung ist (siehe Abb. 1.3 b). Kommt es zu Mutationen in diesem Bereich, entweder erworben oder etwa beim hereditären Li-Fraumeni-Syndrom, wird die Fähigkeit der DNA-Bindung deutlich herabgesetzt und die Funktion des Transkriptionsfaktors p53 empfindlich gestört (Dehner et al., 2005).

1.2.2 Aktivierung, Regulation und Zielgenselektion

Üblicherweise liegt p53 in gesunden Zellen in sehr geringer Konzentration vor und unterliegt äußerst feinen Regulationsmechanismen. Es besitzt eine kurze Halbwertszeit von nur etwa 20 Minuten, so dass Änderungen der Konzentration innerhalb der Zelle in Reaktion auf bestimmte physiologische Signale sehr rasch ablaufen können. Die wichtige negative Regulation von p53 wird durch eine Reihe unterschiedlicher Mechanismen, etwa durch Kontrolle der Aktivität, Stabilität und Lokalisation von p53 in der Zelle, gewährleistet. Dies erfolgt durch Ubiquitinligasen, posttranslationale Modifikatoren von p53 (Acetylasen, Kinasen und andere), transkriptionale Koaktivatoren und weitere Mechanismen (Vousden et al., 2007). Ein besonders wichtiges Kontrollprotein, das eine negativ rückgekoppelte Schleife mit p53 bildet und so eine unangemessene Erhöhung des zellulären p53-Spiegels verhindert, ist die Ubiquitinligase MDM2. MDM2 bindet an p53 und begünstigt durch die Ubiquitinierung von p53 dessen Abbau durch cytoplasmatische Proteasome. Zugleich kommt es zu einer sterischen Blockade der Transaktivierungsdomäne von p53 (Momand et al., 1992; Oliner et al., 1993; Picksley et al., 1993; Haupt et al., 1997). Der Tumorsuppressor ARF greift in diese Rückkopplung ein, indem es an MDM2 bindet und so den Abbau von p53 blockiert (Kamijo et al., 1998). Umgekehrt führt etwa ein „single nucleotide polymorphism“ (SNP) im Bereich des MDM2-Gens zu einer erhöhten Proteinexpression und damit zu einem erniedrigten p53-Spiegel und einem erhöhten Risiko für gewisse Krebsarten (Bond et al., 2004; Whibley et al., 2009). Diese Beispiele zeigen deutlich, wie bereits kleine Unterschiede in der basalen p53-Aktivität einen deutlichen Effekt haben können, und macht die MDM2-p53-Schleife unter anderem zu einem vielversprechenden Angriffspunkt für die Tumorthherapie.

Mit welchen Mechanismen kann nun p53 neben der simplen Erhöhung des zellulären Spiegels einen differenzierten Einfluss auf das Zellschicksal nehmen und mit zahlreichen intrazellulären Signalwegen interagieren?

P53 wirkt in erster Linie als Transkriptionsfaktor und kann als solcher zur Transkription einer großen Breite unterschiedlicher Zielgene führen. Je nachdem welche Gruppe von Zielgenen gebunden wird, resultiert eine spezifische Reaktion. So führt die Transkription der Gene *CDKN1A* (p21) und *GADD45A* beispielsweise zu Zellzyklusarrest

in der G1 respektive der G2 Phase (Levine & Oren, 2009), während etwa die Sestrine SESN1/2 zu Seneszenz führen (Budanov & Karin, 2008; Steelman & McCubrey, 2009). Desweiteren kann p53 die Aktivierung zahlreicher proapoptotischer Gene, wie beispielsweise *BAX*, *FAS*, *PMAIP1* (PUMA), *BBC3* (NOXA) oder *P53AIP1* induzieren (Aylon et Oren, 2007). Die Bindung und Transaktivierung von Zielgenen variiert abhängig von zahlreichen Faktoren, etwa vom genauen Motivaufbau, der Entfernung zum Transkriptionsstart und bindenden Kofaktoren (Qian et al., 2002; Inga et al., 2002; Weinberg et al., 2005). Eine Vielzahl an Kofaktoren und posttranslationalen Modifikationen, welche direkten Einfluss auf die DNA-Bindung und Zielgenselektion besitzen, sind beschrieben, und nur auf eine begrenzte Anzahl kann in diesem Rahmen eingegangen werden. Wichtige potente Regulatoren der apoptotischen Funktion von p53 sind beispielsweise Proteine der ASPP-Familie, ASPP1 und ASPP2. Diese stimulieren die Bindung von p53 an die Promotoren der proapoptotische Zielgene *BAX* und *PIG3*, allerdings nicht die Bindung an die Promotoren von *CDKN1A* und *MDM2* (Samuels-Lev et al., 2001). Ein weiteres Protein, p18/Hamlet interagiert direkt mit p53 und verstärkt durch gezielte Induktion einiger Zielgene die p53-vermittelte Apoptose (Cuadrado et al., 2007; Vousden et Prives, 2009). Andere Faktoren, wie BRN3A oder MUC1 vermitteln - entweder über direkte Bindung an p53 oder an Promotorbereiche der Zielgene - die verstärkte Induktion von p21, während die Expression wichtiger proapoptotischer Gene wie *BAX* oder *BBC3* verringert wird (Hudson et al., 2005; Wei et al., 2005). Im Bereich der N-terminalen TAD führt eine Reihe von Phosphorylierungen durch verschiedene Proteinkinasen, insbesondere an Serin 46, zu der Induktion der Transkription von proapoptotischen Zielgenen - ebenso kann das Zielgenspektrum von p53 beispielsweise durch Acetylierung oder Ubiquitinierung an einem Lysin im Bereich des C-Terminus (K320) zu Genen, welche Zellzyklusarrest und DNA-Reparatur begünstigen, verschoben werden (Vousden & Prives, 2009). Unklar ist allerdings der Mechanismus, mit dem diese Faktoren auf die Zielgenselektion von p53 Einfluss nehmen können.

Ein weiter Aspekt in diesem Zusammenhang ist die DNA- Bindungskoopertativität von p53 (siehe Abb. 1.4). Neben dem völligen Verlust der Funktionen als Transkriptionsfaktor bei einer komplette Eliminierung der DNA-Bindungskoopertativität von p53, zeigte sich, dass auch weniger ausgeprägte Änderungen der Koopertativität Einfluß auf

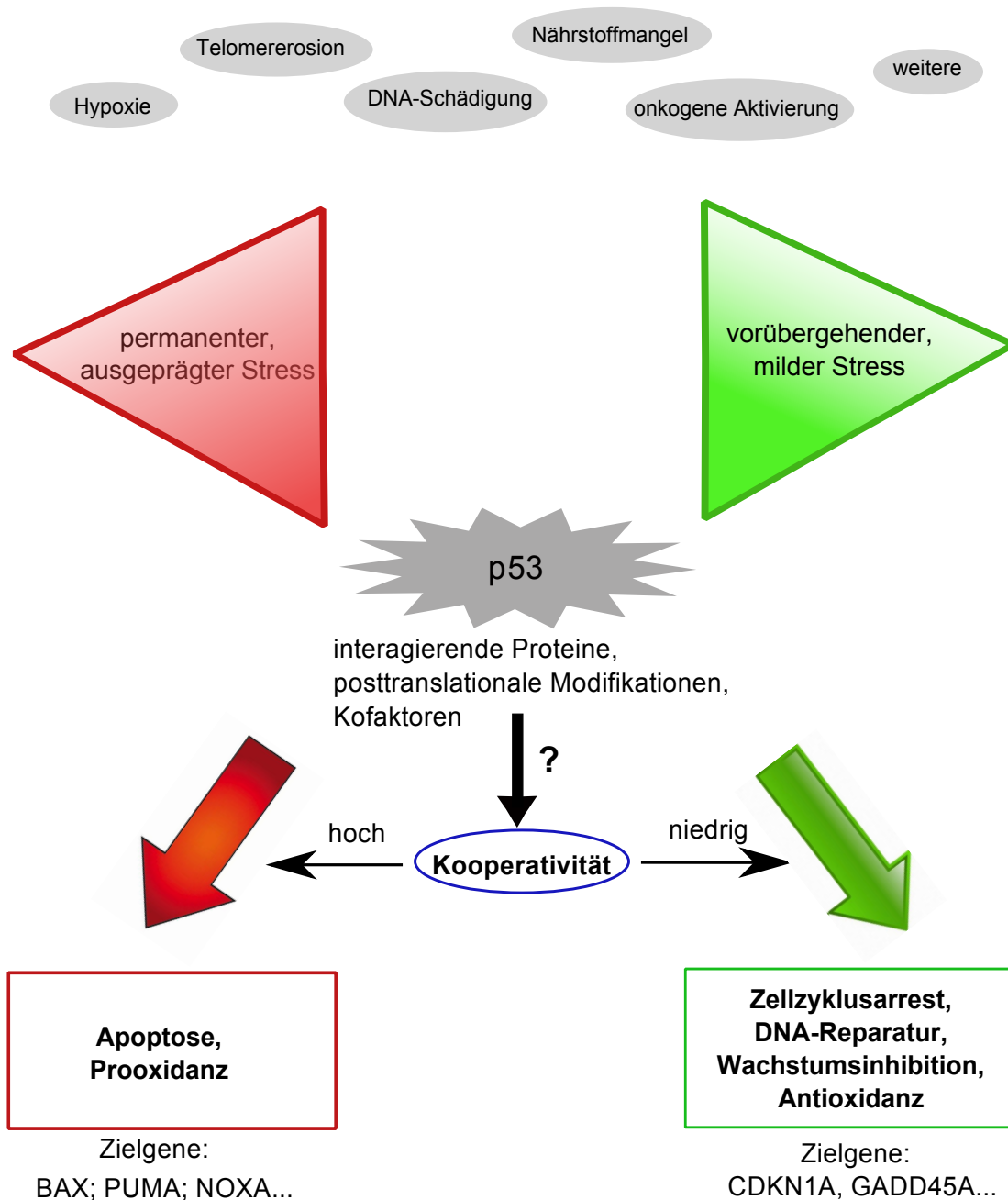


Fig. 1.4: Abhängig von der Art, Dauer und Intensität der Stressreize kann p53 als „Killer“ oder als „Retter“ fungieren. Die DNA-Bindungs Kooperativität hat bei dieser „Entscheidung“ großen Einfluß. Hohe Kooperativität führt zu der Aktivierung von Apoptosezielgenen, während niedrige Kooperativität Zellzyklusarrest und DNA-Reparatur zur Folge hat. Wie die DNA-Bindungs Kooperativität allerdings von interagierenden Proteinen, posttranslationalen Modifikationen und Kofaktoren beeinflusst wird, ist bislang unklar.

die Zielgenselektion haben können. So geht eine hohe DNA-Bindungs Kooperativität mit einer verstärkten Rekrutierung an proapoptotischen Zielgenen und einer stärker ausgeprägter Apoptose einher, während schwächer kooperatives p53 in erster Linie Zellzyklusarrestgene bindet und deutlich schwächer oder gar nicht zur Apoptoseinduktion beitragen kann (Schlereth et al., 2010a). Desweiteren zeigten Analysen von p53-Bindungsstellen (BS) wichtiger Zielgene, dass Zellzyklusarrestgene häufig hochaffine BS für p53 besitzen, während die Affinität der BS von Apoptosegenen im Vergleich sehr variabel und häufig signifikant niedriger ist (Weinberg et al., 2005). Es kann daher vermutet werden, dass die Bindung und Expression des je nach Kontext variablen p53-Zielgenspektrums über eine Modulation der DNA-Kooperativität von p53 reguliert werden könnte.

1.2.3 p53 und Krebs

p53-Inaktivierung und Krebsentstehung sind eng miteinander verbunden. So ist p53 in rund der Hälfte aller humaner Tumoren durch Mutation verändert und in einem großen Teil der restlichen Tumoren andersweitig inaktiviert oder in seiner Konzentration in der Zelle durch einen verstärkten Abbau reduziert (Hollstein et al., 1991). Bereits die Entdeckung und anfängliche Bewertung von p53 steht in engem Zusammenhang mit seiner Rolle in kanzerogen veränderten Zellen. So wurde zunächst angenommen, es handele sich bei p53 um ein Onkogen, da hohe Level des Proteins in Krebszellen nachgewiesen werden konnten (Linzer et al., 1979; Rotter et al., 1983). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass p53 nicht nur mit weiteren Onkogenen, wie beispielsweise HRAS, kooperierte, sondern auch, ähnlich wie das Onkogen MYC, selber das Potential hatte Zellen zu transformieren und deren Immortalisierung zu begünstigen (Eliyahu et al., 1984; Jenkins et al., 1984; Parada et al., 1984). Zu der Erkenntnis, dass es sich bei p53 nicht um ein Onkogen, sondern im Gegenteil um einen Tumorsuppressor handelt, kam man erst Mitte der 80er Jahre als deutlich wurde, dass es sich durch die Verwendung von cDNA aus Krebszellen bei den bisher untersuchten p53-Varianten um mutierte Formen des Wildtyps gehandelt hatte (Eliyahu et al., 1988; Finlay et al., 1988). Diese zum Teil lediglich durch eine Punktmutation des Wildtyps veränderten p53-Mutanten zeigten zum Teil völlig andere Eigenschaften als der Wildtyp, der die

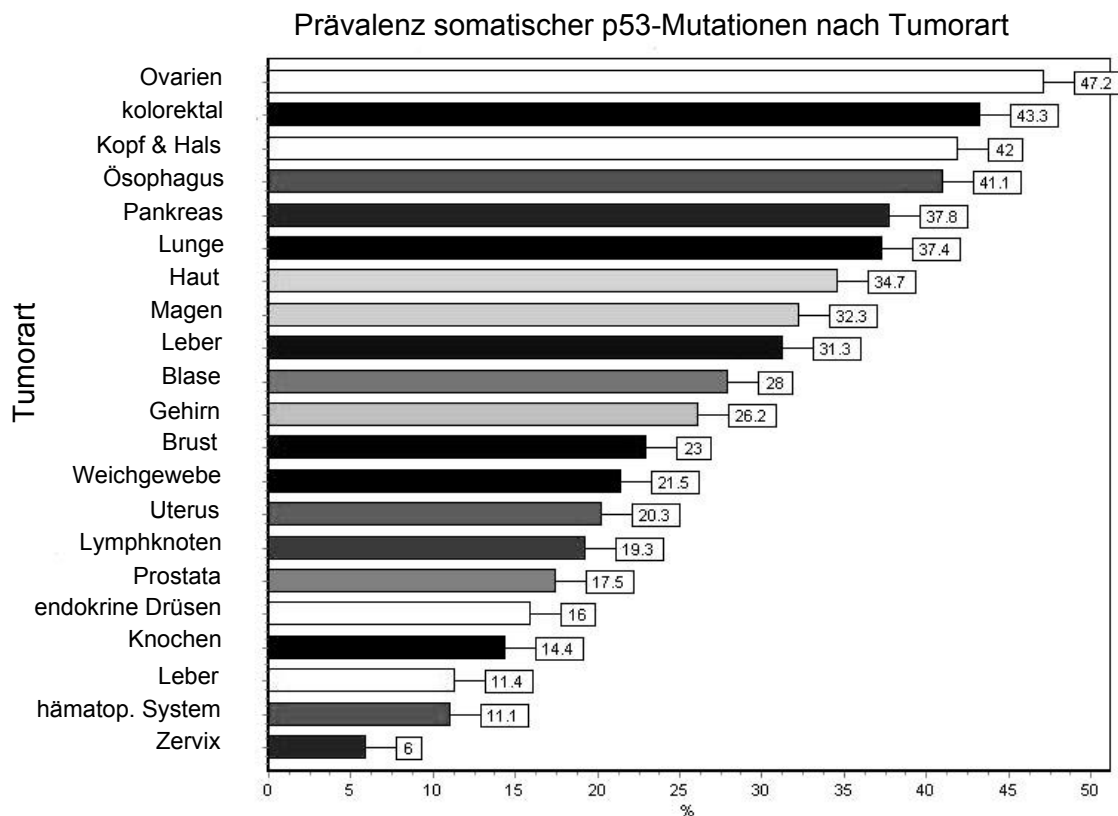


Fig. 1.5: Übersicht über die Prävalenz somatischer Mutationen abhängig von der jeweiligen Tumorart. Der Verlust von Wildtyp-p53 in Tumoren ein relativ häufiges Ereignis. Am häufigsten finden sich Mutationen von p53 bei ovariellen sowie bei kolorektalen Karzinomen, während bei weiteren Krebsarten, etwa des hämatopoetischen Systems, eine Mutation von p53 eher selten vorliegt (nach IARC TP53 Database, R15 release, November 2010).

Transformation zur Tumorzelle eindeutig unterdrückte und somit klar die Kriterien eines Tumorsuppressors erfüllte (Eliyah et al., 1984; Finlay et al., 1989). Weiterhin wurde offensichtlich, dass p53 in einer Vielzahl humaner Tumore verändert vorliegt (siehe Abb. 1.5).

In der Regel beeinträchtigen Mutationen alle tumorsuppressiven Fähigkeiten von p53. Es sind jedoch auch einzelne Mutationen bekannt, die die Funktion von p53 nur partiell beeinträchtigen und bei denen p53 neben einem Verlust der Fähigkeit zur Apoptoseinduktion weiterhin Zellzyklusarrest auslösen kann. Mäuse mit diesen Mutationen zeigten trotz defizienter Apoptose einen gewissen Schutz gegen Tumorentstehung (Rowan et al., 1996; Liu et al., 2004). Weitere Experimente zeigten, dass sowohl ein

gestörter Zellzyklusarrest als auch alternativ das solitäre Fehlen des Proteins PUMA und damit eine eingeschränkte Apoptosefähigkeit jeweils nicht zu einer deutlichen Zunahme der Tumorraten im Mausexperiment führen (Toledo et al., 2006; Michalak et al., 2008). Am häufigsten treten in kanzerogen veränderten Zellen Missensemutationen im Bereich der sequenzspezifischen DNA-Bindungsdomäne (DBD) auf (Abb. 1.2). Über 95% der Mutationen befinden sich im Bereich der DBD, ca. 30 % an sechs Mutations-„Brennpunkten“ (Hollstein et al., 1991; Petitjean et al., 2007). Dabei wird die Fähigkeit der Transaktivierung gestört - meistens durch die Mutation einer Aminosäure, die entweder in direktem Kontakt zur DNA steht oder aber für die räumliche Struktur der DNA-Bindungsdomäne entscheidend ist (Cho et al., 1994). Nicht beeinträchtigt ist in den meisten Fällen die Synthese des Proteins in voller Länge oder der Aufbau des typischen Tetramers. Statt eines vollständigen Ausfalls eines p53-Allels kommt es also „lediglich“ zu der Synthese einer nicht voll funktionsfähigen Variante.

Warum dies dennoch einen großen Effekt auf die Gesamtaktivität von p53 hat, wird deutlich, wenn man den Aufbau von p53 als Tetramer betrachtet. So führt bereits die Mutation eines Allels zur Bildung von Heterotetrameren und damit zu einem fast vollständigen Funktionsverlust von p53. Dies wird durch den Ausdruck „dominant negative Aktivität“ des mutierten p53-Allels über das Wildtyp-p53-Allel beschrieben (Milner et Medcalf, 1991; Chan et al., 2004). Die resultierenden Heterotetramere sind zwar noch in der Lage an die Ziel-DNA zu binden, jedoch mit deutlich herabgesetzter Bindungsstärke (Nicholls et al., 2002; Weinberg et al., 2004b). Üblicherweise folgt während der weiteren Krebsprogression ein „loss of heterozygosity“ (LOH), also ein Verlust des verbleibenden Wildtyp-Allels (Brosh et Rotter, 2009). Mutiertes p53 sammelt sich nun in häufig sehr hohen Konzentrationen in der Zelle an (Rotter et al., 1983; Bartek et al., 1991), kann aber seiner eigentlichen Funktion, der Kontrolle von Zellzyklus und Apoptose, nicht mehr nachkommen. Diesem Funktionsverlust („Loss-of-function“) einerseits steht häufig ein Funktionsgewinn („Gain-of-function“) andererseits gegenüber (Wolf et al., 1984; Brosh et Rotter, 2009). Das mutierte p53 gewinnt gegenüber der Wildtypform onkogene Eigenschaften und vermittelt etwa eine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegenüber Chemotherapeutika (Chin et al., 1992; Bush et al., 2002) oder unterdrückt die Apoptose (Li et al., 1998). Somit führt die Mutation des *TP53*-Gens nicht nur zu der Entwicklung von Krebs, sondern auch zu

einer schlechteren Prognose der Erkrankung.

Neben spontanen p53-Mutationen kann auch das Vorliegen einer Keimbahnmutation von p53 zur Tumorentstehung führen. Bei dem seltenden autosomal dominanten LiFraumeni-Syndrom handelt es sich um eine Krebsprädisposition, welches mit dem Auftreten einer großen Bandbreite an Tumorarten in verhältnismäßig jungem Alter, meist vor dem 46. Lebensjahr, einhergeht. In Familien mit LiFraumeni-Syndrom kommt es bei Mutationsträgern mit sehr hoher Penetranz zu der Entstehung von Tumoren. Zu den typischen Malignomen gehören neben Weichteilsarkomen auch Osteosarkome, Hirntumore, Brustkrebs, Adrenokortikale Karzinome, Leukämie oder das bronchoalveoläre Karzinom (Li et al., 1988; Malkin et al., 1990; Olivier et al., 2010). Neben dem LiFraumeni-Syndrom sind Keimbahnmutationen von p53 vermutlich auch in weiteren hereditären Tumorfällen in bis zu 17% der Fälle vorhanden und mit einem Auftreten von 1/5.000 bis 1/20.000 Geburten deutlich weiter verbreitet als bislang angenommen (Laloo et al., 2006; Gonzales et al., 2009).

1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Zahlreiche Aspekte der Zielgenselektion und Regulation von p53 sind ungeklärt und Gegenstand von Spekulationen. Bekannt ist jedoch, dass die p53-Kooperativität grundlegende Bedeutung für die Zielgenbindung besitzt. Zielsetzung dieser Arbeit war daher die Analyse des Einflusses variabler p53-Kooperativität auf die DNA- und Zielgenbindung. Um Aussagen über diese Zusammenhänge treffen zu können, wurden Chromatin-Immunopräzipitationen mit anschließender Sequenzierung der gebundenen DNA-Fragmente (ChIPseq) von Wildtyp-p53, sowie im Bereich der H1-Helix veränderten p53-Mutanten durchgeführt.

Entscheidend für die Kooperativität ist die beschriebene Interaktion zweier p53-Monomere im Bereich der „H1-Helices“. An Position 180 im Bereich der H1-Helix befindet sich bei Wildtyp-p53 die negativ geladene Aminosäure Glutamat (E), an Position 181 ein positiv geladenes Arginin (R), welche durch die entgegengesetzte Ladung Salzbrücken ausbilden und damit zur intermolekularen Interaktion führen.

Im Vorfeld dieser Promotion wurden eine Reihe von H1-Helix-Mutanten generiert, die im Vergleich mit Wildtyp-p53 eine verstärkte oder abgeschwächte intradimere

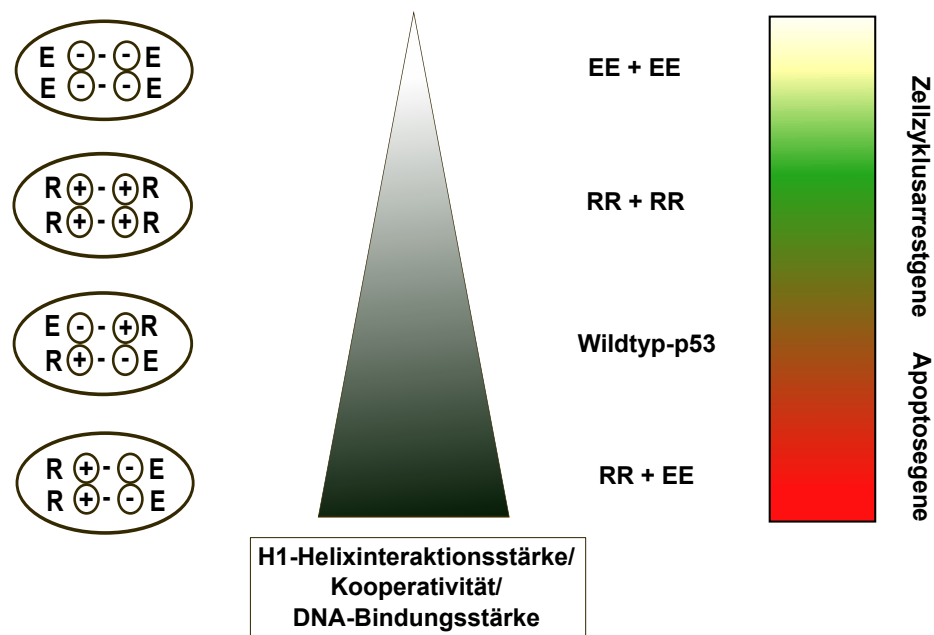


Fig. 1.6: Die Interaktionsstärke der H1-Helices und damit einhergehend die Kooperativität, sowie die DNA-Bindungsstärke von p53 an die DNA, wurden durch Austausch von Aminosäuren in Position 180 bzw. 181 variiert. Mit zunehmender Kooperativität erweitert sich das Spektrum gebundener und exprimierter Zielgene in Richtung der Apoptose.

Kooperativität und damit variierende DNA-Bindungs Kooperativität aufweisen. Die in dieser Arbeit verwendeten invertierenden Mutationen E180, R181E („EE“), sowie E180R, R181 („RR“) zeigen im Vergleich mit Wildtyp-p53 eine deutlich reduzierte H1-Helix-Interaktion. In der Kombination der Mutanten E180R,R181 + E180, R181E („RR + EE“) in einer Zelle kommt es zu der Bildung gemischter Tetramere, bei denen jeweils eine positive mit einer negativen Ladung interagiert. Es resultiert eine Verstärkung der Interaktion der H1-Helices respektive der Kooperativität im Vergleich mit p53-Wildtyp.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die H1-Helixmutanten EE, RR und RR+EE, sowie Wildtyp-p53 durch adenovirale Transfektion in p53-negative SAOS2-Zellen eingebracht. Bereits in vorangegangenen ChIP-Chip-Analysen hatten Schlereth et al., 2010a, zeigen können, dass eine Erhöhung der Kooperativität zu einer Ausweitung des Zielgenspektrums von Zellzyklusarrest- auf Apoptosegene führt (siehe Abb. 1.6). Diese Beobachtung wurde mithilfe des ChIPseq-Verfahrens verifiziert, wobei die ChIPseq im Unterschied zur ChIP-Chip-Analyse eine Untersuchung des kompletten Genoms möglich machte. Bei den an die ChIPseq anschließenden bioinformatischen

Analysen lag der Fokus auf Genen aus den Bereichen Apoptose, Zellzyklusarrest und DNA-Reparatur, jedoch wurde zusätzlich die Anreicherung von Genen weiterer biologischer Prozesse untersucht. Zudem wurden Bindungsstellen der unterschiedlichen H1-Helix-Varianten auf Vorliegen und Variationen der bekannten p53-Konsensussequenz untersucht. Abschließend wurden die Daten der ChIPseq mit Ergebnissen aus Mikroarrayanalysen korreliert, um Aussagen zur kooperativitätsabhängigen Zielgenexpression treffen zu können.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Materialien

Alle Materialien, Enzyme und Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, von folgenden Firmen bezogen: Amersham, Applichem, Beckman Coulter, BD Pharmingen, BioRad, Fermentas, Greiner, Invitrogen, NEB, Noras, PAA, Promega, Qiagen, Roche, Roth Sigma, Stratagene.

2.1.1 Lösungen, Puffer und Medien

Alle Lösungen und Verdünnungen wurden mit Reinstwasser aus einer Wasseraufbereitungsanlage „Purelab ultra ELGA“ der Firma LabWater mit einem spezifischen Widerstand von 18,2 M Ω x cm hergestellt.

2.1.2 Allgemeine Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen für die ChIP

18,5% Paraformaldehyd

- 18,5% (w/v) Paraformaldehyd
- 7,5 mM KOH

SDS-Lysepuffer

- 1% (w/v) SDS
- 10 mM EDTA
- 50 mM Tris-HCl (pH 8,1)

Verdünnungspuffer

- 0,1% (w/v) SDS
- 1,1% (w/v) Triton X-100
- 1,2 mM EDTA (pH 8,0)
- 16,7 mM Tris-HCl (pH 8,1)

Niedrigsalzpuffer-Immunkomplex-Waschpuffer

- 0,1% (w/v) SDS
- 1 % (w/v) Triton X-100
- 2 mM EDTA (pH 8,0)
- 20 mM Tris-HCl (pH 8,1)
- 150 mM NaCl

Hochsalz-Immunkomplex-Wascherpuffer

- 0,1% (w/v) SDS
- 1 % (w/v) Triton X-100
- 2 mM EDTA (pH 8,0)
- 20 mM Tris-HCl (pH 8,1)
- 500 mM NaCl

LiCl- Immunkomplex-Waschpuffer

- 250 mM LiCl
- 1 % (w/v) IGEPAL-CA360
- 1% (w/v) Desoxycholsäure
- 2 mM EDTA (pH 8,0)
- 20 mM Tris-HCl (pH 8,1)

TE - Puffer

- 1 M Tris-HCl (pH 8,0)
- 0,5 M EDTA (pH 8,0)

Elutionspuffer

- 100 mM NaHCO₃
- 1% (w/v) SDS

Lösungen und Puffer für den Western Blot

RIPA - Puffer

- 150 mM NaCl
- 50 mM Tris-HCl (pH 8,0)
- 0,1% (w/v) SDS
- 1% (v/v) Triton X-100
- 1% (w/v) Natrium-Desoxychlorat
- 1 mM EGTA

5 x SDS-PAGE-Puffer

- 125 mM Tris
- 1,25 mM Glycin
- 0,5% (w/v) SDS

5 x Blotpuffer

- 970 mM Glycin
- 125 mM Tris-HCl
- 15% (v/v) Methanol

10 x TBS(T)

- 1,5 M NaCl
- 500 mM Tris-HCl (pH 7,5)
- (- 1% (v/v) Tween20)

Polyacrylamid (PAA)-Gel

Trenngel 12%	Substanz	Sammelgel 5%
4,3 ml	H ₂ O	3,2 ml
2,5 ml	1,5 M Tris-HCl pH 8,8	
	0,5 M Tris-HCl pH 6,8	1,25 ml
3,0 ml	Acrylamid Mix (40%)	0,5 ml
17 μ l	30% APS	12,25 μ l
6 μ l	TEMED	8 μ l

Zellkultur

In der Zellkultur kamen Lösungen und Kulturschalen der Firmen Sarstedt sowie Greiner zur Anwendung.

DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium, high glucose, (4,5 g/l) with L-glutamine, with sodium pyruvate, GIBCO, Invitrogen).

Hinzugefügt wurden:

- 8 μ g/ml Ciprofloxacin
- 1 μ g/ml Amphotericin B
- 100 U/ml Penicillin
- 100 μ g/ml Streptomycin
- FCS - 10 % für normale Zellkultur
 - 2 % für adenovirale Infektion

PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 1x, GIBCO, Invitrogen)

Trypsin-EDTA-Lösung 10x (Sigma), 1:5 verdünnt in PBS

2.1.3 Enzyme und allgemeine Biomoleküle

Name	Hersteller
Chelex100	BioRad
Protein G Magnetic Beads	Cell Signaling
RNase A	AppliChem
Proteinase K	Applichem

2.1.4 Zelllinien

Name	Ursprung	Referenz
SAOS-2-Zellen	humane Osteosarkomzellen	DSMZ: ACC 243

2.1.5 Adenoviren

Alle Viren wurden mithilfe des AdEasy Adenoviral Vector System (Stratagene) und Ad293-Zellen generiert.

Name	Insert des pAdTrack-CMV
AdGFP	-
AdGFP-p53WT	p53WT-Flag
AdGFP-p53RR	p53RR-Flag
AdGFP-p53EE	p53EE-Flag

2.1.6 Antikörper

Name	Klon	Firma	ChIP	Western Blot
p53 Do1	Ab-6	Santa Cruz	1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	1 : 5000
Goat- α -mouse, HRP-gekoppelt	-	Amersham	-	1 : 3500

2.1.7 Größenmarker

Proteinmarker

Die Molekulargewichte der Proteine im PAA-Gel wurden mithilfe des „Prestained Protein ladder“ der Firma Fermentas bestimmt.

Nukleinsäuremarker

Zur Bestimmung der Größe von DNA-Fragmenten wurde der „GeneRuler™ DNA ladder mix“ verwendet.

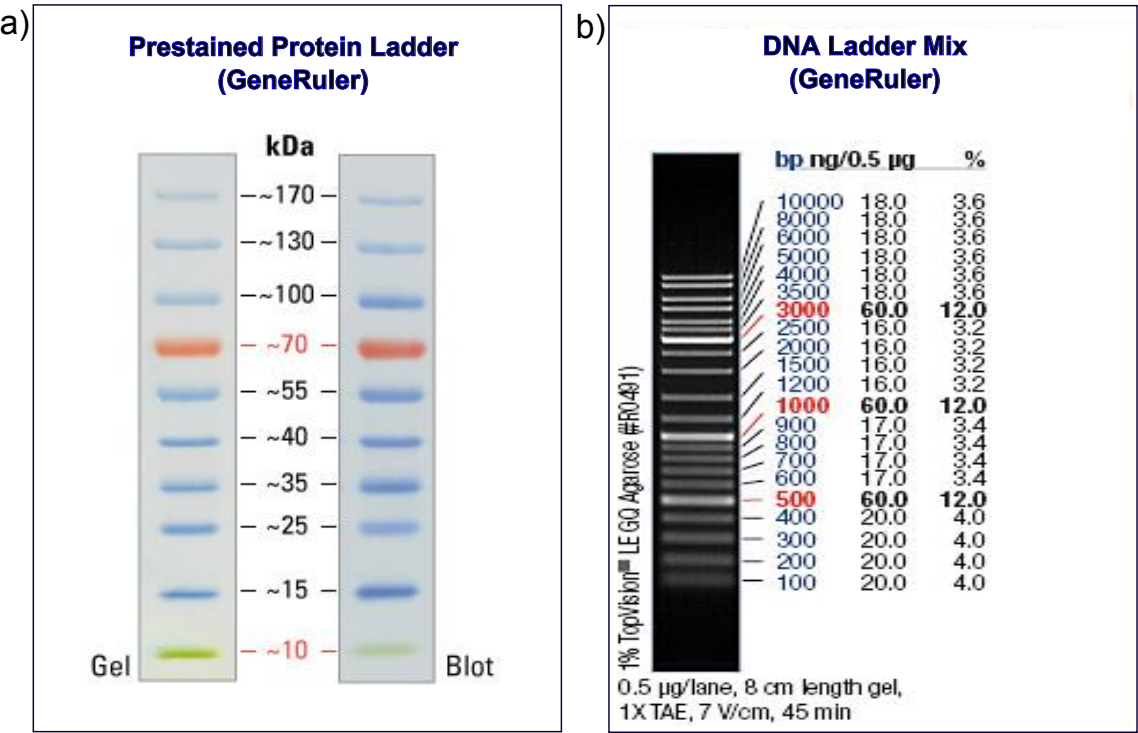


Fig. 2.1: Proteinmarker (a) und Nukleinsäuremarker (b)

2.1.8 Oligonukleotide

Die Bestimmung der Oligonukleotidsequenzen für die quantitative PCR erfolgte mithilfe des Onlineprogramms Real-time PCR Primer Design der Firma Genscript. (www.genscript.com)

Sequenz	Sense	Antisense
RR+EE 1	GGAAGGTATGGACACTCCGT	GTCTCAGGCATCCTTGTGTG
RR+EE 2	ACTGTGGCTTTGCCTGTTTA	CGACCAAAGTGAGCACCTC
RR+EE 3	GGCCTGCCAGGACTTGTAGT	CTGCATTTCCCGTGCATC
RR+EE 4	TCTTAAGTTTGACACTGAGGAGAAA	TCACTTTCTGACCTTGTGAGC
RR+EE 5	TGACGGTTAACTGGAAACCA	AGAAGGACTTGGAATGTCAG
RR+EE 6	CATTTTCAGTGAGGAGGCGAA	CCAGGGACAGGGAGGTAGAG
RR+EE 7	TCCAGGGACAGATTCTAGGC	TTTCTGCATCCTGAATCAAAGT
RR+EE 8	GGATCCAGATTTCCTGAGCAT	CCCTGTGCGATATACCAAGA
RR+EE 9	GAATGGGAAGATTGAACACTCA	CCAATCTCTAGACACATCTTTGC
RR+EE 10	CTTCTAGTCTACAATGAGCAGGAGA	CATTCCCTGTCCCTCCTCCAAA
RR+EE 11	TGACATGAAGCCCACACG	AGAAGGTCAGACAGGAGGCA
RR+EE, wt 1	GAAGTGTGGCTATGCAAAC	TTGCATGTCCACACTCACTG
RR+EE, wt 2	CAGGAATTATGTGAACACCAGTT	TCACCCAATATCGAAATCCC
RR+EE, wt 3	TGTCTGCAGCACAAGTCTCA	ATCCTGAGTCTGGAATCTTGG
RR+EE, wt 4	CATGCAAGCATTCCTCAGGT	GTCACACTTTGGTGCCATTC
RR+EE, wt 5	CCCTCTGCTCTGACTGGTTT	GCACACACACACTGACTTGC
RR+EE, wt 6	GGTCTGTGTACATGCAAAGGA	CAGTAAGCCTCAAAGTTAGCCA
RR+EE, wt 7	AATTTGTGACAGGCATCAGC	TCTTCCATTTCTCCCTTTCC
RR+EE, wt 8	TCTCTGCCTTCCTGGATTCT	TCCAGTACTCTGGTGTCTTTGG
RR+EE, wt 9	TGTAAACCAGGAACATTGGG	ACCTGTGTCCCTCACCCCTT
RR+EE, wt 10	TTCAACAAGACTCACTTCCTGATG	TCTTCAGAAGGTTGGGACAA
RR+EE, wt 11	AAGCCAGCAGATGAAAGCC	CTCAGTCATGTTGGGACACG
RR+EE, wt, RR 1	TTGTTTCAGAAAGCCCAACCTC	TGGCAAACGTGCAGTTAAGA
RR+EE, wt, RR 2	GGGAGGAGAATTGAAAGGG	TCTCACCTCACTGGCTCTCA
RR+EE, wt, RR 3	CAGACACGTCTTGTGCCATA	GGTAGATGCACAATTCGCAA
RR+EE, wt, RR 4	AGAATTACAACCTGAGGTCCTGT	TGGCACTAAATAAGGGCTGA
RR+EE, wt, RR 5	CTGCTTTCTTGTGTCAGAG	GCATGTGCTGGTCATGTGTA
RR+EE, wt, RR 6	TGGAACATGCTCAGAACACA	GGGCTACTCAGGAAGCTGAC
RR+EE, wt, RR 7	AGAATCAGCATTTAAGGAAGTGG	CCAGCAGTACACTGTGGGAT
RR+EE, wt, RR 8	CGATCTGAATTCGTGAGCTTC	GGCTGCCACAGTAATTAGCC
RR+EE, wt, RR 9	TTTACCCTTCTCTGTTTGTCTTG	TTTAGTTAGCCTGATTGAGAGTCAGT
RR+EE, wt, RR 10	CTGGGACAAGTTCCTCTGGT	GAAGAACAAGTCCTGGGCAT
all 1	CCAGCCCAGATCCTAACTGT	GCGGGCTTGTCTCTGCTT
all 3	GCAGCAACACAAACCCATTA	TCATGGTCACATTCCAAAGG
all 4	AACGAGAGACGAAGGTGGAT	CGAGCTCCACAATGCTT
all 5	CAAGTCGACACCTTCCTTCA	CCTTTCAGGCAGAAGTAGCC
all 6	CTCTGCTCCAGGACATGGT	CTTGCCCACTGCTCTAAGG
all 7	AAAGGACTTTGCCCTTCCTT	GCACTGCTTTCTGCTACACC

Gen	Sense	Antisense
SERPIN1	ACCACAGAGGAGGCTTGTTTC	CTTAGAACAGGCAAGGGACAG
BAI1	AAGGGAAGCTAGCAGGGTCT	CCAGACACTCACACGCAGA
APAF1	ATACAAGAAACGCCCCGAAAG	TCTGTGCCTCTGTCTTGACC
SESN2	GTAGGCACCTGGGACTGG	CTCCCTCCAAAGCAGGAGT
SERPINB5	TATTTACCTTCCGGTCCTG	TGCATACGTACAGACATGCG
CD82	TTCTCATCAACCCACACCTC	GGAAGTAGCCCAGAACAAACC
SFN	GTCCACAGAGTTCGGAGAT	GTGTTGCTGGCTGCAGAG
TNFRSF10B	GGCTTCACGCAGCTTACTC	TGTAAATTCCCGAATCCAGTG
TP53I3	CTGAGTGCTGTTGAGAGGGA	GGCGGACTTAATGCAGGTA
GADD45A	TTGCCTGATTGTGGATCTGT	TAGCACATCTCGGCTGAAAG
RRM2B	CCAGTTTCCGACTGACTCAA	AGTGCTTGCTGGGAAATCTT
DDB2	TCGCATAGAGCACAGTACCC	GAGGTCTTCTGGGTTTCTGG
CCNG1	TGAGGTGCCTTTCGTGTCT	AAGGCAGGAGGTCTTCAGAG
CDKN1A -2283 (5´)	AGCAGGCTGTGGCTCTGATT	CAAAATAGCCACCAGCCTCTTCT
CDKN1A +11443	TCTGTCTCGGCAGCTGACAT	ACCACAAAAGATCAAGGTGAGTGA

2.1.9 Laborgeräte, Materialien und Kits

Laborgeräte

Bezeichnung	Firma
Absaugsystem BioChem-VacuuCenter BVC 21 NT	Vacuubrand
Autoklav Systec VE-150	Systec
Brutschrank Heraeus B6	Heraeus Instruments
Drehrad L28	Labor Band
Elektrophorese-Kammer	Biometra
Feinwaage CP225D	Sartorius
Filmkassetten 13 x 18cm	Dr. Goos-Suprema
Fluoreszenz-Scanner Odyssey-Imager	Li-Co Biosciences
Fluoreszenzmikroskop FSX100	Olympus
Gefrierschrank comfort	Liebherr
Gefrierschrank UF85-300S und 450S	Heraeus
Gelkammer PowerPac	Biorad
Inkubator HERAcell 240	Heraeus
Kühlschrank	Siemens
Küvetten für Bradford Essay	Sarstedt
Laser-Scanner Odyssey-Imager	Li-Cor-Bioscience
Mikrowelle	Severin
Nanodrop ND-1000	PeqLab
Nanodrop ND-3300	PeqLab
Nass-Blott-Apparatur	PeqLab
Nitrocellulose-Membran Hybond TM -ECL TM	Amersham
PCR Purification Kit	Qiagen
pH-Meter FiveEasy	Mettler Toledo
Photometer BioPhotometer	Eppendorf
Pipetus Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte
Sterile Werkbänke Klasse 2	Thermo Scientific
Sonifikator	Bandelin electronics

Bezeichnung	Firma
Thermocycler Mx3005P	Stratagene
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Tiefkühlgerät (-80°C)	Thermo Scientific
Ultrazentrifuge L7-ultrazentrifuge	Beckman coulter
Vortex genie 2	Scientific industries
Waage PLB 1000-2	Kern
Wasseraufbereitung Purelab ultra ELGA	LabWater
Zentrifuge 5415R	Eppendorf
Zentrifuge Avanti J-20 XP	Beckman coulter
Zählkammer Neubauer-improved	Marienfeld

Verbrauchsmaterialien und Kits

Bezeichnung	Firma
Bradford Protein Essay	Bio-Rad
Deckgläschen	Knittel Gläser
Falconröhrchen	Greiner Bio-One, Sarstedt
Filterspitzen	Sarstedt
Flüssiger Stickstoff	Tyzka Industrie Gase
Kryogefäße	Greiner Bio-One
Nitrocellulose Membran ECL Hybond	Amersham
Objektträger	Roth
Pipetierspitzen	Sarstedt
Pico Green	Molecular Probes
Protein C Magnetische Beads	Cell Signaling
Reagiergefäße (0,2; 1,5 und 2 ml)	Sarstedt
SuperSignal West Dura Extended Duration Substrat	Pierce
QIAGEN PCR-Puification Kit	Qiagen
Röhrchen (15 und 50ml)	Greiner Bio-One, Sarstedt
Whatman Filterpapier	Schleicher und Schuell
Zellkultur Multiwell-Platten	Greiner Bio-One, Sarstedt
Zellkultur Schalen	Sarstedt

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Kultivierung adhärenter Zellen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre in beschichteten Zellkulturschalen. Als Zellkulturmedium wurde DMEM verwendet.

Die Passage der Zellen wurde jeweils vor dem Erreichen der Konfluenz vorgenommen. Dazu wurden die Zellen nach Abnahme des Mediums einmalig mit PBS gewaschen und anschließend zur Ablösung von der Zellkulturschale unter Inkubation bei 37°C mit Trypsin behandelt. Die Kontrolle erfolgte am Lichtmikroskop. Nach vollständiger Ablösung wurden die Zellen in DMEM-Medium resuspendiert und in Verdünnung gleichmäßig auf die Zellkulturschale ausgebracht. Das Zählen der Zellzahl erfolgte mit dem Hämocytometer nach Neubauer am Phasenkontrastmikroskop. Die Zellzahl wurde folgendermaßen bestimmt:

$$\text{Anzahl Zellen pro Großquadrat} \times 10.000 = \text{Zellen pro ml}$$

Infektion eukaryotischer Zellen mit Adenoviren

Im Zuge der Chromatingewinnung für die Chromatin-Immunopräzipitation wurden SAOS2-Zellen mit Adenoviren, welche Gene für unterschiedliche p53-Konstrukte (p53WT, p53EE, p53RR) oder als Kontrolle GFP beinhalteten, infiziert.

Um eine angemessene Virusinfektionsrate sowie eine gleichmäßige Proteinexpression der unterschiedlichen p53-Konstrukte sicherzustellen, wurde zunächst zur Kontrolle eine Western-Blot-Analyse durchgeführt.

Für die Infektion einer 15cm-Schale wurde eine angemessene Virusmenge in 2ml DMEM + 2 % FCS gelöst und gleichmäßig auf den zuvor mit PBS gewaschenen Zellen verteilt. Die Inkubation erfolgte für 30 Min. bei 37°C und 5% CO₂ unter zweimaligem Schwenken um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern und eine gleichmäßige Verteilung der Adenoviren zu gewährleisten. Anschließend wurde 18ml DMEM + 10% FCS-Medium hinzugegeben und die Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ für 18h

fortgesetzt.

Die Bestimmung der Infektionseffizienz wurde anhand der Expression von GFP unter dem Fluoreszenzmikroskop optisch durchgeführt. Anschließend erfolgte die weitere Behandlung und Ernte der Zellen anhand des ChIPseq-Protokolls.

2.2.2 Western Blot

Die Lyse der Zellen wurde auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden durch Abschaben im Medium geerntet, durch Zentrifugation (400xg, 4°C, 5 min) pelletiert und einmalig mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde dann in Lysepuffer resuspendiert. Die freigesetzte genomische DNA wurde durch Sonifikation fragmentiert (einmalig 10 sec) und unlösliche Zellbestandteile durch Zentrifugation (16 000xg, 4°C, 15 min) entfernt. Die Proteinkonzentration wurde mithilfe des Bradford-Protein-Essay (Bradford 1976) mit einer geeigneten Standardkurve determiniert.

Die Zelllysate wurden durch SDS-PAGE in einem diskontinuierlichen Puffersystem mithilfe eines Sammel-, sowie eines Trenngels unter denaturierenden Bedingungen separiert (Bailey & Elkan, 1994). Vor dem Beladen des Gels wurden die Zelllysate mit ROTI LOAD 4x (Roth) versetzt und für 5 min auf 95°C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte zunächst 20 Minuten bei 90 V, anschließend bei konstant 150 V. Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend in einem Nass-Blot-Verfahren bei 100 V für 60 min auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen.

Um eine unspezifische Antikörperbindung zu verhindern, wurde die Nitrocellulose-Membran für 1h in TBST-Lösung mit 10% Milchpulver inkubiert. Danach wurde der Antikörper in einer 5% igen Milch-TBST-Lösung zur Membran gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dem folgenden Waschen (3 x 30 sec, dann 3 x 3 min) mit TBST fand die Immunreaktion des sekundären Antikörpers ebenfalls in einer 5% igen Milch-TBST-Lösung für 1h statt. Die zuvor beschriebenen Waschschritte wurden wiederholt und anschließend wurde die Chemilumineszenz mithilfe des „SuperSignal West Dura Extended Duration“ Substrats (Pierce) entsprechend den Herstellerangaben detektiert. Das Fluoreszenzsignal wurde mithilfe des Laser-Scanner „Odyssey-Imager“ aufgenommen.

2.2.3 Chromatin-ImmunoPräzipitation

Die ChIP dient dem in-vivo Nachweis von Interaktionen zwischen Proteinen und DNA. Dazu wird zunächst durch Zugabe von Paraformaldehyd eine kovalente Bindung zwischen Proteinen und DNA hergestellt. Im Anschluß daran wird die DNA durch Sonifikation fragmentiert und die relevanten kovalent gebundenen Protein-DNA-Komplexe durch Zugabe eines Antikörpers, welcher wiederum mit dem C-Fragment an eine feste Phase bindet, immunopräzipitiert. Die nichtgebundenen Proteine und DNA werden in mehreren Waschgängen entfernt und die immunopräzipitierten Protein-DNA-Komplexe durch einen Elutionsvorgang von der festen Phase gelöst. Die Proteine werden nun durch einen Proteinaseverdau entfernt und die isolierte DNA-Lösung aufgereinigt.

Um eine ausreichende große Menge DNA für die anschließende Sequenzierung zu erhalten, wurde die Chromatin-Immunopräzipitation dreimalig mit einer großen Ausgangszellzahl durchgeführt.

Die Fixierung erfolgte durch 1% PFA-Lösung, welche für 10 min auf die Zellen aufgebracht wurde. Zum Abbrechen der Reaktion wurde Glycin in einer Konzentration von 125 mM für 5 min hinzugegeben. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen im Kühlraum von den Zellkulturplatten mithilfe eines weichen Schabers abgelöst und in 2 ml PBS mit Proteinaseinhibitor überführt. Durch Zentrifugation (700g, 4°C, 5 min) wurden die Zellen pelletiert und der Überstand entfernt. Die Zellen wurden in einer Konzentration von 2×10^7 Zellen/ml in SDS-Lysepuffer mit Proteinaseinhibitor resuspendiert. Anschließend erfolgte die Fragmentierung der DNA im Eisbad mit dem SONOPLUS Sonicator (Bandelin Electronics) bei 30% Power mit einer Dauer von 10 sec je einmal minütlich. Die Anzahl der Pulse lag volumenabhängig bei 4 bis 5, die gewünschte Fragmentgröße von 200 bis 800 bp wurde mittels Agarosegel überprüft.

Die erneute Zentrifugation erfolgte bei 10.000g und 20°C für 10 min. Anschließend wurde der Überstand (geschehrtes Chromatin) in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Für eine ChIP setzten wir 1×10^7 Zellen ein. Diese wurden im Verhältnis 1:10 mit Verdünnungspuffer verdünnt und 1% als Input-DNA entnommen. Die Input-DNA wurde bei 4°C über Nacht gelagert. Parallel erfolgte nach Zugabe der Antikörper die Immunreaktion unter ständiger Rotation bei 4°C für 16h. Im Anschluß daran wurde weitere zwei Stunden bei 4°C mit „Protein G Magnetischen Beads“ (Cell Signaling) inkubiert,

um die Präzipitation der Protein-Antikörper-Komplexe zu gewährleisten. Anschließend erfolgte das je einmalige Waschen mit Niedrigsalz-Immunkomplex-Waschpuffer, Hochsalz-Immunkomplex-Waschpuffer und LiCl- Immunkomplex-Waschpuffer, sowie das zweimalige Waschen mit TE-Puffer.

Die Elution der präzipitierten Protein-DNA-Komplexe geschah durch zweimalige Zugabe von 100 μ l Elutionspuffer für jeweils 15 min unter konstantem Schütteln mit 800 rpm. Dieser Schritt wurde analog für den Input durchgeführt. Das Aufbrechen der Protein-DNA-Verbindung wurde durch 200 mM NaCl-Lösung über Nacht durchgeführt.

Der RNase-Verdau erfolgte für die Proben und Input für 30 min bei 37°C, der Proteinase-Verdau für 2h bei 45°C.

Die anschließende Aufreinigung der DNA-Lösung erfolgte mit dem QIAGEN PCR-Purification Kit nach zugehörigem Protokoll mit 1000 μ l Bindungspuffer, sowie 2 x 30 μ l Elutionspuffer. Um eine ausreichende Menge DNA (über 10ng auf 40 μ l) zu erhalten, wurde die Chromatin-Immunopräzipitation dreimalig nach identischem Protokoll durchgeführt und anschließend die Proben GFP, sowie EE aufgrund der geringen DNA-Konzentration gepoolt und anschließend im Eppendorf-Concentrator eingedampft um ein Endvolumen von 40 μ l mit einer ausreichenden DNA-Konzentration zu erreichen. Der Input wurde entsprechend 1:10 mit QIAGEN-Elutionspuffer verdünnt um die DNA-Konzentration zu vermindern. Die Messungen der DNA-Konzentrationen erfolgten mithilfe von PicoGreen (Molecular Probes) und dem Nanodrop-ND 3300. Zur Verifizierung des ChIP-Verfahrens wurde 1 μ l der DNA eingesetzt um mittels qPCR die bekannte Bindung am CDKN1A-Promotor (5'-BS) zu überprüfen.

2.2.4 Quantitative realtime-PCR (qPCR)

Die qPCR ermöglicht die Quantifizierung der Anfangsmenge der Template-DNA. Dabei werden die *de novo* amplifizierten DNA-Moleküle während der PCR-Reaktion mit Hilfe von interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen oder Fluoreszenz-markierten DNA-Sonden detektiert. Hier wurde der „SYBR Green Jump-Start Taq ReadyMix“ (Sigma) verwendet.

Jede Probe wurde unter Verwendung folgenden Ansatzes in Dreifachbestimmung analysiert:

10 μ l 2 x SYBR Green Mix

0,4 μ l Primer Sense

0,4 μ l Primer Antisense

7,2 μ l H₂O

1 μ l ChIP-DNA

Die PCR wurde im „Thermocycler Mx3005P“ (Stratagene) mit folgendem Programm durchgeführt:

1. Denaturierung: 94°C 2 min

40 Zyklen:

2. Denaturierung: 94°C 15 sec

3. Annealing: 60°C 20 sec

4. Elongation: 72°C 20 sec

Die Auswertung der qPCR erfolgte durch die Δ Ct-Methode. Der Ct ergibt sich aus dem PCR-Zyklus, bei dem die Expression einen vorher gesetzten Schwellenwert im linearen Bereich überschreitet. Die ChIP-DNA der jeweiligen Probe wird mit der Input-DNA verglichen und der Unterschied der Ct-Werte über die Formel Δ Ct = Ct(ChIP-DNA) - Ct(Input-DNA) berechnet. Die Umrechnung in lineare Werte erfolgt mittels der Formel $x=2^{-\Delta Ct}$, die Auswertung der Rohdaten mit Hilfe von Microsoft Excel.

2.2.5 Sequenzierung

Das gewonnene DNA-Material wurde dreifach sequenziert. Zunächst mit dem „Genome Analyzer GA IIx“ von Illumina mit dem „36-Cycle Sequencing Kit v4“ (Illumina) entsprechend der Herstellerangaben mit einer Sequenzlänge von 35 bp. Zwei weitere Sequenzierungen mit einer Sequenzlänge von jeweils 50bp erfolgten mit dem HiSeq 2000 (Illumina).

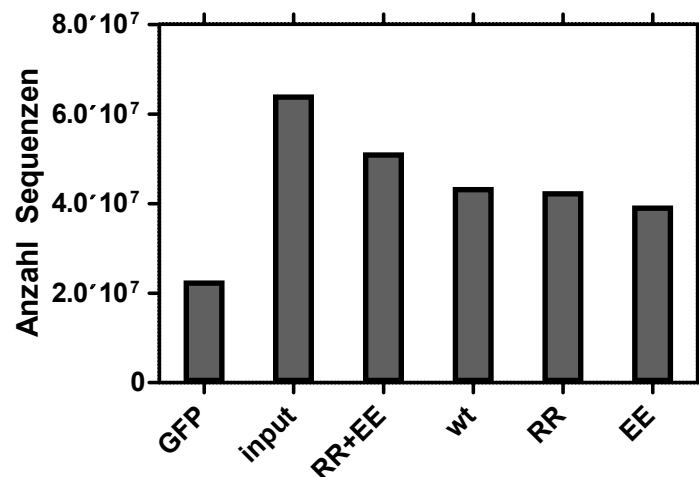


Fig. 2.2: Übersicht über die Anzahl der einfach perfekt an das humane Genom angelagerten Sequenzen für die unterschiedlichen Mutanten, bzw. Negativkontrolle GFP und Input

Kartierung an das Referenzgenom

Die resultierenden Sequenzen wurden einheitlich auf 35bp gekürzt und mittels BOWTIE (Langmead et al 2009) an das humane Genom (Human Genome hg19/GRCh37/Feb.2009) kartiert. Die Anzahl einmalig perfekt angelagerter Sequenzen aus allen drei Sequenzierungsläufen ist aus Abbildung 2.2 ersichtlich.

2.2.6 Datenanalyse

Die Detektion von mit DNA-Fragmenten angereicherten Regionen (Peak Calling) erfolgte durch die „PARTEK Genomics Suite Software“ (St Louis, MO, USA) mithilfe des „ChIPseq analysis workflow“ mit folgenden Einstellungen:

Mittlere Fragmentlänge:	100 bp
Größe des Bereichs, in dem gesucht wird:	100 bp
FDR:	< 0,00001

Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse der ChIPseq-Analyse der Mutanten untereinander zu gewährleisten, musste eine Normalisierung der Sequenzanzahlen pro Bindungsstelle für die jeweiligen Mutanten vorgenommen werden. Dies basiert auf der

Tatsache, dass für alle Sequenzierungsläufe die selbe Menge an ChIP-DNA bei jeweils unterschiedlicher Anzahl p53-Bindungsstellen eingesetzt wurde und daraus resultierend die Einzelpeaks bei schwach kooperativen Mutanten mit wenig Bindungsstellen durchschnittlich von mehr Sequenzen gestützt werden.

Mutante	Normalisierung
RR+EE	1 normalisierte Sequenz = 51 nichtnormalisierte Sequenzen
wt	1 normalisierte Sequenz = 43,3 nichtnormalisierte Sequenzen
RR	1 normalisierte Sequenz = 42,3 nichtnormalisierte Sequenzen

Viele detektierte DNA-Regionen zeigten nur eine vergleichsweise geringe Anreicherung an ChIP-Sequenzen. Um von einer spezifischen p53-Bindung ausgehen zu können, legten wir daher als Grenzwert eine Mindestanzahl von 3 normalisierten Sequenzen fest. Dies entspricht 152 nichtnormalisierten Sequenzen für RR+EE, 130 nichtnormalisierten Sequenzen für Wildtyp-p53 und 127 nichtnormalisierten Sequenzen für RR.

Da die nächstliegenden Gene zu den identifizierten Bindungsstellen zum Teil einen sehr großen Abstand aufwiesen, wurde desweiteren ein Grenzwert für einen maximalen Abstand zum nächsten Zielgen von 10.000 Basenpaaren gesetzt. Die Anzahl der sich aus diesen Parametern ergebenden Bindungsstellen und Zielgenen ist aus der folgenden Tabelle zu entnehmen:

Mutante	Anzahl Bindungsstellen	Anzahl Zielgene
RR+EE	4854	1661
wt	2351	758
RR	267	91

Ausgehend von diesen Bindungsstellen wurden Listen von gemeinsam bzw. differentiell gebundenen Bindungsstellen, sowie Genen erstellt und diese weitergehend analysiert. Die Visualisierung der Bindungsstellen erfolgte mithilfe des Partek-internen Genome Browsers.

2.2.7 De Novo Motivsuche

Die Suche nach angereicherten Motiven erfolgte mit dem MEME-Algorithmus (Multiple Em for Motif Elicitation; Bailey & Elkan 1994). Da der MEME-Algorithmus mit maximal 60 000 Charakteren arbeitet und zudem eine möglichst gute Vergleichbarkeit der Analysen gewährleistet werden sollte, wurden jeweils 200 zufällig ausgewählte BS analysiert.

Folgende Einstellungen wurden gewählt:

Motivhäufigkeit pro Sequenz: 0 - 1

Motivlänge: min. 6 bp und max. 50 bp

Alle MEME-Ergebnisse wurden mittels TOMTOM (Gupta et al. 2007) mit der JASPAR- Datenbank abgeglichen um eine Ähnlichkeit mit bekannten Motiven zu überprüfen.

2.2.8 ROC-Kurven

Durch ROC-Analysen wurde untersucht, inwiefern die identifizierten de novo Motive an Bindungsstellen angereichert vorliegen. Alle untersuchten Gruppen wurden dazu auf 262 randomisierte Bindungsstellen eingeschränkt, um eine Vergleichbarkeit untereinander sicherzustellen. Die „Richtig-Positive-Rate“ (TPR) wurde gegen die „Falsch-Positive-Rate“ (FPR) bei unterschiedlichen Sensitivitäten aufgetragen. Als Parameter für den Anstieg der ROC-Kurve wurde die Fläche unter der Kurve (Area under the Curve, AUC) verwendet, die üblicherweise einen Wert zwischen 0,5 und 1 annimmt. Eine Kurve nahe der Diagonalen deutet auf eine zufällige Verteilung hin, bei der die Trefferquote der Falsch Positiven Rate entspricht. Je steiler die Kurve ansteigt und je größer der zugehörige AUC-Wert, desto stärker angereichert liegt das Motiv in den analysierten Bindungsstellen vor.

2.2.9 Funktionelle Analyse des Zielgenspektrums

Funktionelle Annotation der gebundenen Gene

Um die identifizierten Zielgene funktionell zu annotieren, wurde zunächst eine Analyse mit Gene Ontology (GO)-Signaturen (<http://www.geneontology.org>, Ashburner et al., 2000) mithilfe von GATHER (Gene Annotation Toll to Help Explain Relationships; <http://gather.genome.duke.edu>) vorgenommen. Da zahlreiche Gene nicht eindeutig annotiert werden konnten, wurden alle Zielgene zusätzlich über ihre Beschreibung bei „Gene Cards“ (<http://www.genecards.org/>) auf Ihre Zugehörigkeit zu den Gruppen „Proapoptose“, „Antiapoptose“, „Zellzyklusarrest“ oder „DNA-Reparatur“ überprüft und eingeteilt.

Gene Set Enrichment-Analyse (GSEA)

Um die Anreicherung von Gensets unter den identifizierten Zielgenen zu bestimmen, wurde eine GSEA (Gene Set Enrichment Analysis; Mootha et al. 2003; Subramanian et al. 2005) durchgeführt. Dazu wurde die nach absteigender RR+EE-Sequenzanzahl geordnete Liste mit insgesamt 1721 Zielgenen im .rnk (ranked list file format) - Format verwendet. Es wurde eine Mindestgröße der auf Anreicherung zu überprüfenden Gensets von 15 Genen festgesetzt und die Genliste ohne Einschränkung auf ein Datenset verwendet. Ansonsten wurden die Standardeinstellungen beibehalten. Auf Anreicherung untersucht wurden 825 GO-Gensets (C5) aus dem Bereich Biology Process Ontology .

Um bei der anschließenden Auswertung unterschiedlich große Datensets miteinander vergleichen zu können, wurde eine Normalisierung mit der Formel

$$y = \text{runningES} \times \frac{nES_{max}}{ES_{max}}$$

durchgeführt.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Genomweite funktionelle Analyse von p53-Bindungsstellen via ChIPseq

In dieser Arbeit wurde die Auswirkung von H1-Helix-Mutationen an den Positionen 180 und 181 und der damit einhergehenden abgeschwächten beziehungsweise verstärkten p53-Kooperativität auf das DNA-Bindungsverhalten und die Zielgenbindung von p53 untersucht. Die H1-Helices sind Teil der DNA-Bindungsdomäne von p53 und entscheidend für die Interaktion je zweier p53-Monomere, die Voraussetzung für die sequenzspezifische DNA-Bindung ist. Zentrale Rolle spielen die Aminosäuren Glutamat (E) an Position 180 und Arginin (R) an Position 181, welche durch entgegengesetzte Ladung Salzbrücken ausbilden und damit zur intermolekularen Interaktion führen. Mutanten mit der invertierenden Mutation E180, R181E („EE“) oder auch E180R, R181 („RR“) zeigen im Vergleich mit Wildtyp-p53 eine deutlich reduzierte H1-Helix-Interaktion, während die Kombination der Mutanten E180R, R181 + E180, R181E („RR + EE“) in einer Zelle zu der Verstärkung der Interaktion der H1-Helices respektive der Kooperativität führt. Abhängig von der Kooperativität kommt es zu einer stärkeren oder schwächeren Bindung von p53 an die DNA, was zu der Bindung und Expression unterschiedlicher Gensets führt (siehe Abb. 1.6).

Um Aussagen über den Einfluß der Kooperativität auf die DNA-Bindung von p53 treffen zu können, wurden Chromatin-Immunopräzipitationen mit anschließender Sequenzierung der gebundenen DNA-Fragmente (ChIPseq) durchgeführt. Die Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) dient dem in-vivo Nachweis von Interaktionen zwischen Proteinen und DNA (siehe Abb. 3.1). In p53-negativen SAOS2-Zellen

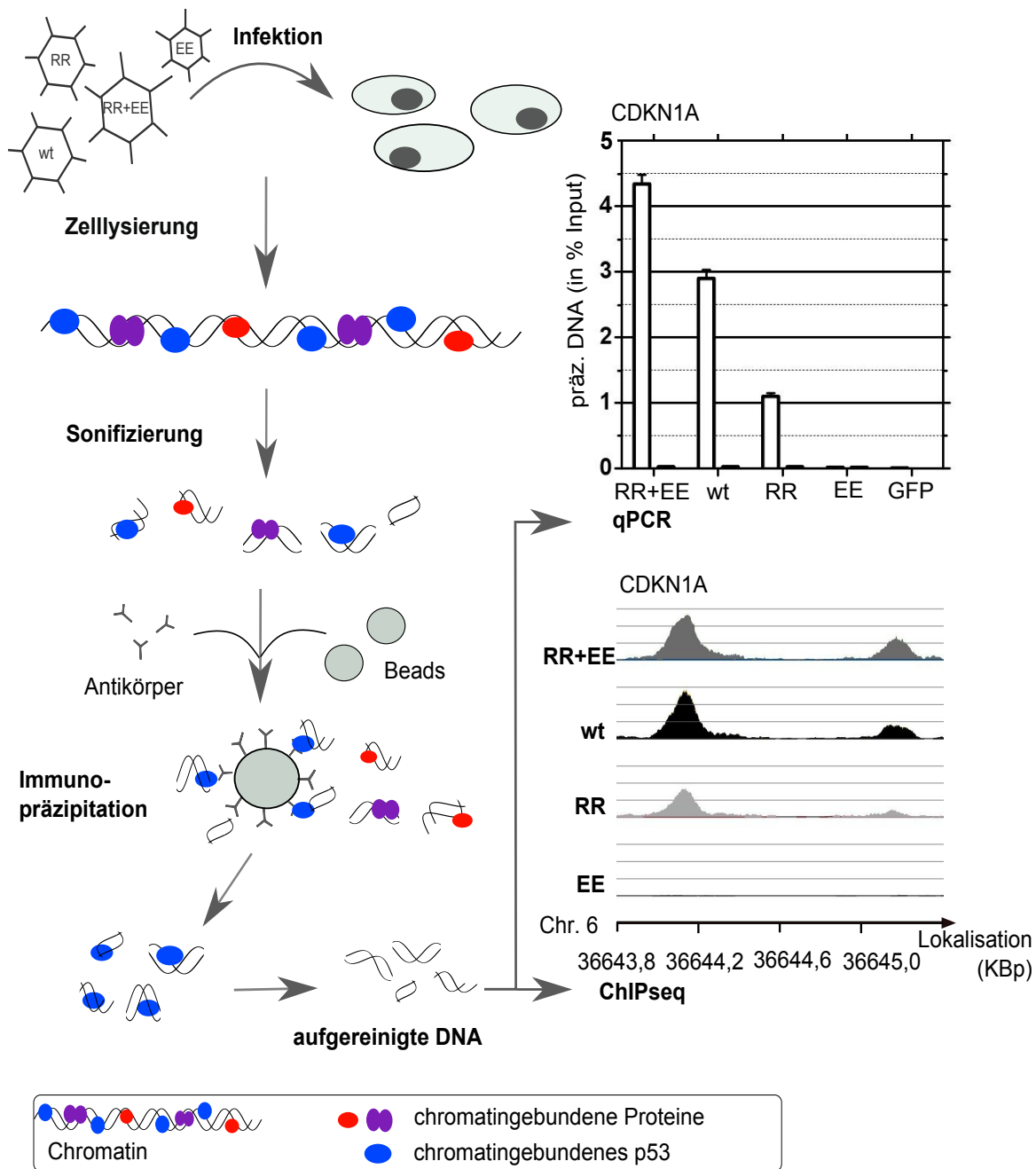


Fig. 3.1: Durchführung der Chromatin-Immunopräzipitation. Nach Transfektion von SAOS2-Zellen wurde das kovalent an die DNA gebundenen Zielprotein nach Zelllyse und Fragmentierung der DNA immunopräzipitiert. Die an das Zielprotein gebundene DNA wurde im Anschluß zur qPCR und zur Sequenzierung (ChIPseq) eingesetzt. Abgebildet sind qPCR mit DNA-Bindung in % vom Inputchromatin (+ Standardabweichung; n=3), sowie ChIPseq-Bindungsprofile der bekannten p53-Bindungsstelle des *CDKN1A*-Promotorbereiches im Genomebrowser.

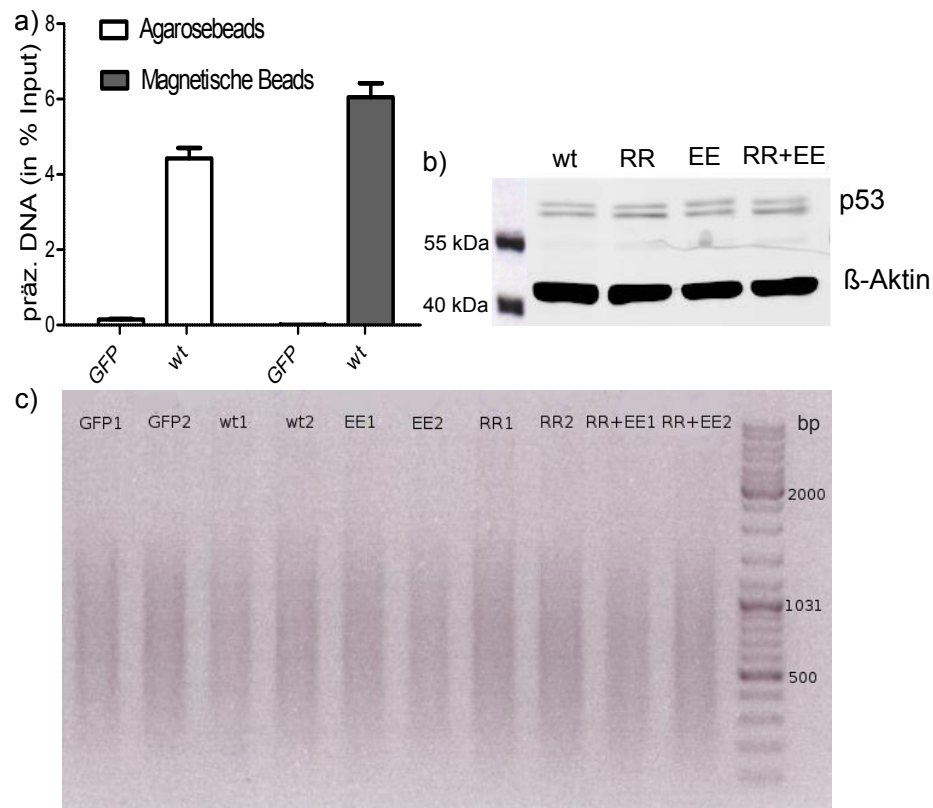


Fig. 3.2: Vergleich des Einsatzes von Agarosebeads (weiß) mit magnetischen Beads (grau). Dargestellt sind qPCRs von der bekannten p53-Bindungsstelle im Bereich des p21-Promotors mit durch Chromatin-Immunopräzipitation gewonnener DNA von Wildtyp-p53 sowie GFP als Negativkontrolle. Abgebildet ist die DNA-Bindung in % des Inputchromatins (+ Standardabweichung; n=3) (a). Western Blot zur Ermittlung der Virusmengen, die beim p53-ChIP zur gleichmäßigen Proteinexpression der p53-Mutanten RR, EE, RR+EE, sowie des Wildtyps in SAOS2-Zellen führen (b) und exemplarische Kontrolle der Sonifizierung der zellulären DNA (c).

wurden über adenovirale Infektion die p53-Konstrukte RR, EE, Wildtyp-p53, RR+EE sowie als Negativkontrolle GFP eingebracht. Eine kovalente Bindung zwischen DNA und Proteinen wurde durch Inkubation mit Paraformaldehyd erreicht, im Anschluß wurden die Zellen lysiert und die DNA durch Sonifikation fragmentiert. Die Chromatin-Immunopräzipitation erfolgte durch die Zugabe von Antikörpern gegen p53 und magnetischer Beads als Trägersubstanz. Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch Waschgänge entfernt. Die immunopräzipitierten p53-Moleküle mit der kovalent gebundenen DNA wurden eluiert, p53 durch Proteinaseverdau entfernt und die DNA aufgereinigt.

Im Vorfeld der ChIPseq wurden einige Vorexperimente durchgeführt, um die

ChIP-Methodik zu optimieren. Zunächst wurden verschiedene Beads als Trägersubstanz für die Immunopräzipitation gegeneinander getestet. Mit den bereits etablierten Agarosebeads wurden magnetische Beads verglichen. Diese zeigten gegenüber den Agarosebeads mehrere Vorteile, sowohl in der unkomplizierteren Handhabung als auch in einem geringeren Hintergrund bei höherer Anreicherung der durch Wildtyp-p53 gebundenen DNA in der Kontroll-qPCR (siehe Abb. 3.2 a). Ferner wurde durch Western Blot die benötigte Virusmenge für eine gleichmäßige Proteinexpression aller p53-Mutanten ermittelt (siehe Abb. 3.2 b) und die Fragmentierung der DNA auf geeignete Fragmentlängen nach erfolgter Sonifizierung überprüft (siehe Abb. 3.2 c).

Desweiteren wurde die ChIP-DNA mittels PCR auf die Anreicherung bekannter p53-Bindungsstellen hin untersucht. Es konnte eine Bindung von p53-Wildtyp, sowie der p53-Mutanten RR+EE und RR an die p53-Bindungsstelle des *CDKN1A*-Promotor nachgewiesen werden, nicht hingegen an den als Negativkontrolle dienenden Bereich gut 11.000 Basenpaare unterhalb des *CDKN1A*-Transkriptionsstarts, was einem Bereich hinter dem Gen entspricht (siehe Abb. 3.3). Diese Ergebnisse bestätigen das zu erwartende Bindungsverhalten von p53, die Etablierung der ChIPseq-Methodik war somit erfolgreich.

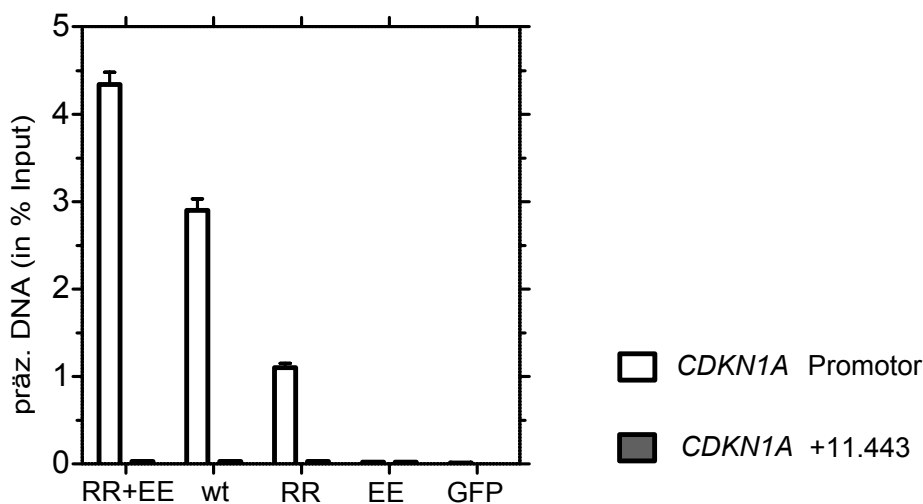


Fig. 3.3: Abgebildet ist die Bindung der ChIP-DNA am *CDKN1A*-Promotor (Transkriptionsstart - 2283 bp) mittels qPCR (weiß). Die Negativkontrolle erfolgte an einem hinter dem Gen gelegenen Bereich (Transkriptionsstart + 11.443 bp) (grau). Abgebildet ist die DNA-Bindung in % des Inputchromatins (+ Standardabweichung; n=3).

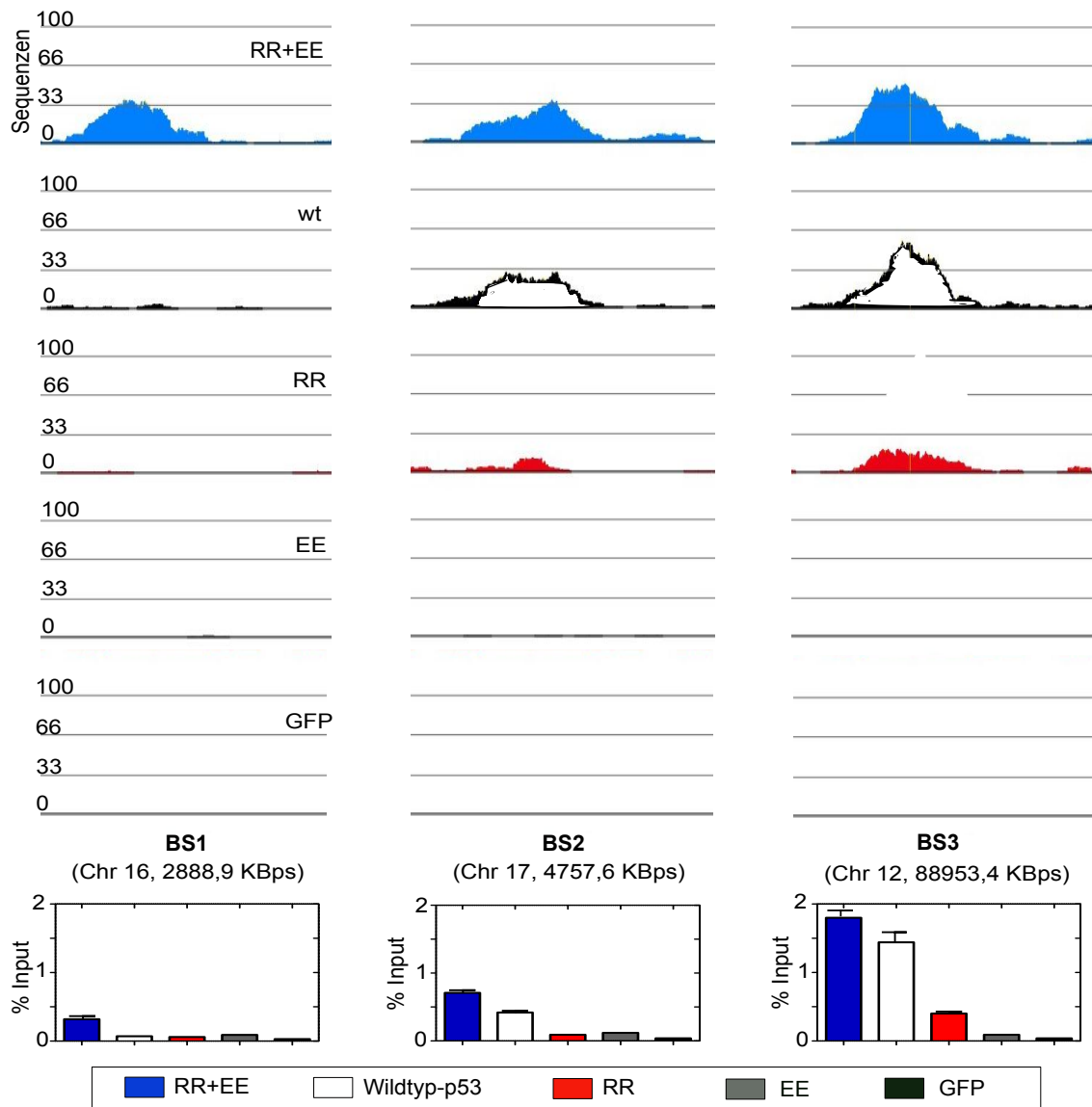


Fig. 3.4: Exemplarische Darstellung dreier p53-Bindungsstellen (BS 1-3) mit Bindung der p53-Mutanten RR+EE (blau), Wildtyp-p53 (weiß), RR (rot), EE (grau) und GFP (schwarz). Als Negativkontrolle dient GFP (schwarz). Jeweils Darstellung im Partek Genome Browser, sowie der zugehörigen Validierungs-qPCRs mit DNA-Bindung in % vom Inputchromatin (+ Standardabweichung; n=3).

Bei der ChIPseq wurden die in der ChIP isolierten DNA-Sequenzen durch das sogenannte „sequencing by synthesis“-Verfahren sequenziert. Bei diesem Verfahren kommen Nukleotide zum Einsatz, die mit einem reversiblen fluoreszenzmarkierten Terminator versehen sind. Während der DNA-Doppelstrangsynthese wird nach dem Einbau jedes Nukleotids zunächst das nukleotidspezifische Fluoreszenzsignal gemessen, bevor der Terminator gelöst und das nächste Nukleotid angefügt wird. Parallel werden

so eine große Anzahl an 35bp langen Sequenzen ermittelt. Als nächster Schritt erfolgt die bioinformatische Auswertung, in der die Sequenzen an das menschliche Genom aligniert und grafisch dargestellt werden können. Lokale Anreicherungen von Sequenzen bilden dabei sogenannte „Peaks“.

Das „Peakcalling“, also die Identifikation von Sequenzanreicherungen („Peaks“) erfolgte mithilfe des ChIPseq Workflows von Partek mit einer stringenten Filterung einer FDR von $< 0,00001$. Um die Bindung der eingesetzten p53-Mutanten und des Wildtyps trotz variierender Menge an Gesamtsequenzen und Gesamtpeaks quantifizieren und miteinander vergleichen zu können, wurde eine Normalisierung der Sequenzanzahlen durchgeführt. Eine Bindungsstelle (BS) wurde definiert als Peak, der durch mehr als drei normalisierte Sequenzen gestützt wird und nicht in den Negativkontrollen GFP oder Input nachweisbar ist.

Zur Validierung der in der ChIPseq identifizierten BS wurden 22 zufällige BS mittels qPCR überprüft. Drei validierte Gene werden exemplarisch in Abb. 3.4 dargestellt. BS1 zeigte für die p53-Mutante RR+EE eine deutliche Sequenzanreicherung, nicht hingegen für Wildtyp-p53, p53-RR, p53-EE oder die Negativkontrolle GFP. Dies bestätigte die qPCR, die ebenfalls ausschließlich für p53-RR+EE eine Sequenzanreicherung aufwies. An BS2 waren p53-RR+EE, sowie Wildtyp-p53 deutlich und p53-RR leicht angereichert, was den zugehörigen qPCR-Daten entsprach. An BS3 zeigten p53-RR+EE, Wildtyp-p53 und p53-RR in der ChIPseq sowie der entsprechenden qPCR deutliche Anreicherung, nicht hingegen p53-EE oder GFP.

Zusätzlich wurden 13 BS von Zielgenen aus dem p53-Signalweg untersucht. Abb. 3.5 zeigt exemplarisch die grafische Darstellung der ChIPseq-Daten im Genome-Browser sowie die entsprechenden qPCR-Analysen der p53-BS im Bereich der Gene BAI1 und GADD45A. An der BAI1 zugehörigen BS waren in erster Linie Sequenzen der stark kooperativen p53-Mutante RR+EE angereichert. Deutlich weniger Sequenzanreicherung ließ sich für Wildtyp-p53 beobachten. Dies entsprach den Daten der zugehörigen qPCR. Für GADD45A zeigten hingegen p53-RR+EE, Wildtyp-p53, sowie p53-RR in der ChIPseq als auch in der qPCR deutliche Sequenzanreicherungen. Die Daten der ChIPseq konnten somit mittels qPCR erfolgreich validiert werden (Genome Browser-Darstellung weiterer BS von Apoptose, Zellzyklusarrest- und DNA-Reparaturgenen im Anhang).

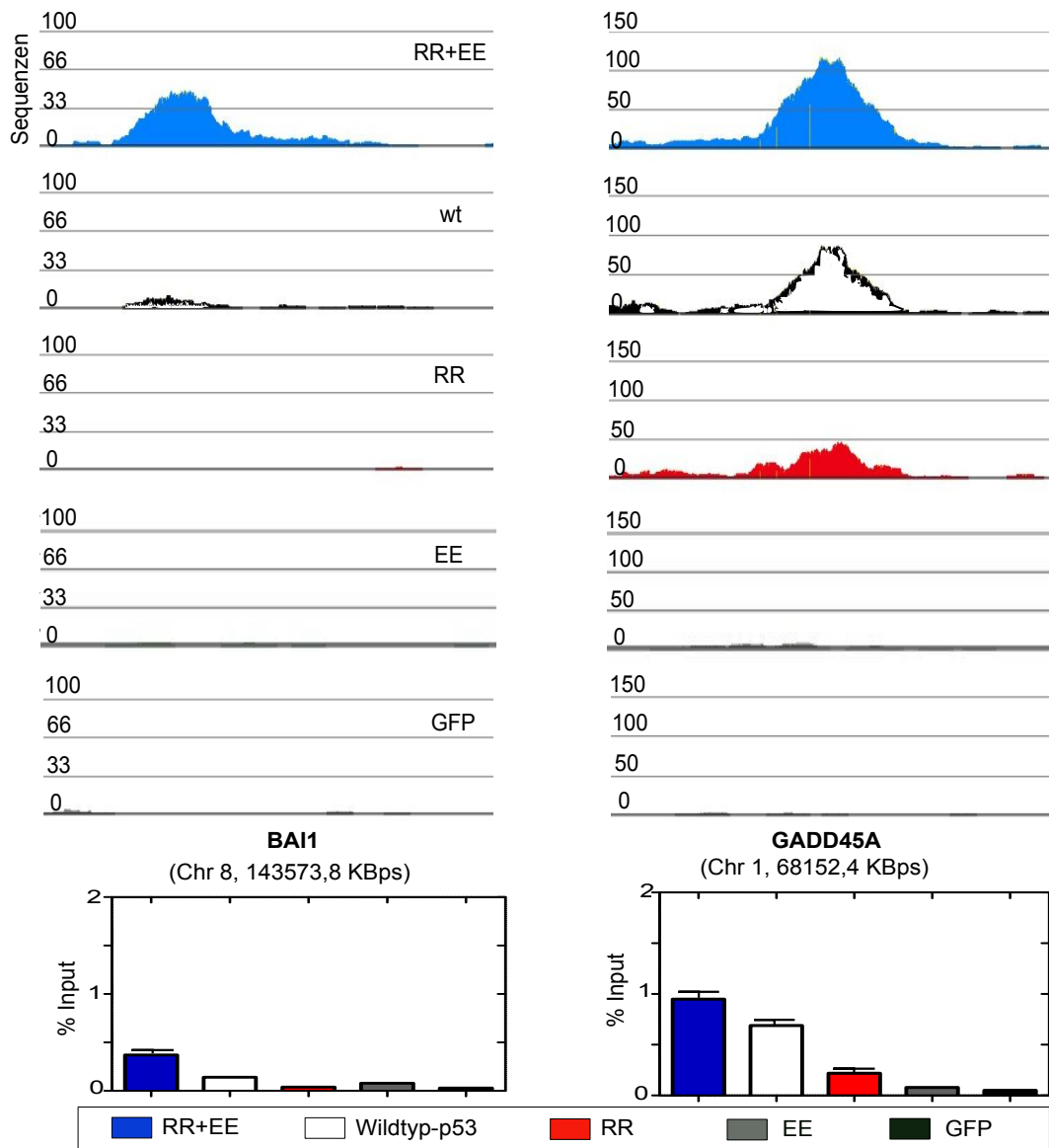


Fig. 3.5: Bindungsprofile der Gene BAI1 und GADD45A im Partek Genome Browser mit Bindung der p53-Mutanten RR+EE (blau), Wildtyp-p53 (weiß), RR (rot), EE (grau) und GFP (schwarz). Aufgetragen die Anzahl der angereicherten Sequenzen (siehe auch Abb 6.1 und 6.5 im Anhang). Zu beachten sind die unterschiedlichen Achsenbeschriftungen von BAI1 und GADD45A. Darunter die zugehörige Validierungs-qPCRs mit DNA-Bindung in % vom Inputchromatin (+ Standardabweichung; n=3).

Die Validierung der DNA-Bindung der kaum bis nicht kooperativen p53-Mutante EE gelang hingegen nicht. Mittels qPCR von neun DNA-Bereichen, an denen p53-EE in der ChIPseq eine Anreicherung von Sequenzen zeigte (vier Bereiche mit einer FDR von $< 0,00001$, in denen Wildtyp-p53 und alle Mutanten Sequenzanreicherung zeigten; fünf Bereiche ohne Beschränkung der FDR, an denen ausschließlich p53-EE

Anreicherung zeigte) konnte keine Bindung von p53-EE nachgewiesen werden. Davon ausgehend wird angenommen, dass die Kooperativität der p53-Mutante EE soweit eingeschränkt ist, dass keine spezifische DNA-Bindung auftritt. P53-EE wurde daher von den Analysen zu Bindungsmotiv und Zielgenspektrum ausgenommen (Darstellung einiger exemplarischer Bereiche in denen EE angereichert vorlag siehe Abb. 6.8 im Anhang).

3.1.1 Die Anzahl der BS und damit der direkten Zielgene steigt mit zunehmender Kooperativität

In der vorliegenden ChIPseq-Analyse lag der Schwerpunkt auf der Untersuchung des Einflusses der Kooperativität von p53 auf das in vivo - Bindungsmuster an die DNA und der daraus resultierende Zielgenselektion.

Es ergaben sich für p53-RR+EE insgesamt 4854 BS, rund doppelt so viele wie für Wildtyp-p53 mit 2351 BS und knapp 20fach mehr als für die p53-Mutante RR mit 267 BS. Dementsprechend reduzierte sich auch die Anzahl an direkten Zielgenen mit abnehmender Kooperativität (siehe Tab. 3.2). Als direkte Zielgene wurde in diesem Zusammenhang das nächstgelegene Gen bezeichnet. Da die Auswirkung der p53-Bindung auf die Transkription sehr weit entfernt gelegener Gene fraglich ist, wurde eine maximale Distanz der BS zum Gen von 10.000 Basenpaaren zugelassen.

Mutante	Anzahl Bindungsstellen	Anzahl Zielgene	Sequenzanzahl/BS
RR+EE	4854	1661	7,9
Wildtyp-p53	2351	758	4,4
RR	267	91	0,96

Tab. 3.1: Übersicht über die Anzahlen der in der ChIPseq identifizierten BS, Zielgene sowie durchschnittlichen Sequenzzahlen/BS für RR+EE-p53, Wildtyp-p53 und RR-p53

Doch nicht nur die Gesamtanzahl der BS war bei stark kooperativen Mutanten höher, sondern auch die durchschnittliche Sequenzanzahl pro BS, welche ein Maß für die Bindungsstärke von p53 an die DNA darstellt, nahm mit zunehmender Kooperativität um ein Vielfaches zu (siehe Tab. 3.2 sowie Abb. 3.6). Dabei wies p53-RR+EE durchschnittlich knapp doppelt so viele Sequenzen/BS auf wie Wildtyp-p53 (Faktor 1,8) und 8 mal so viele wie p53-RR. Diese Beobachtung stützte die Vermutung, dass

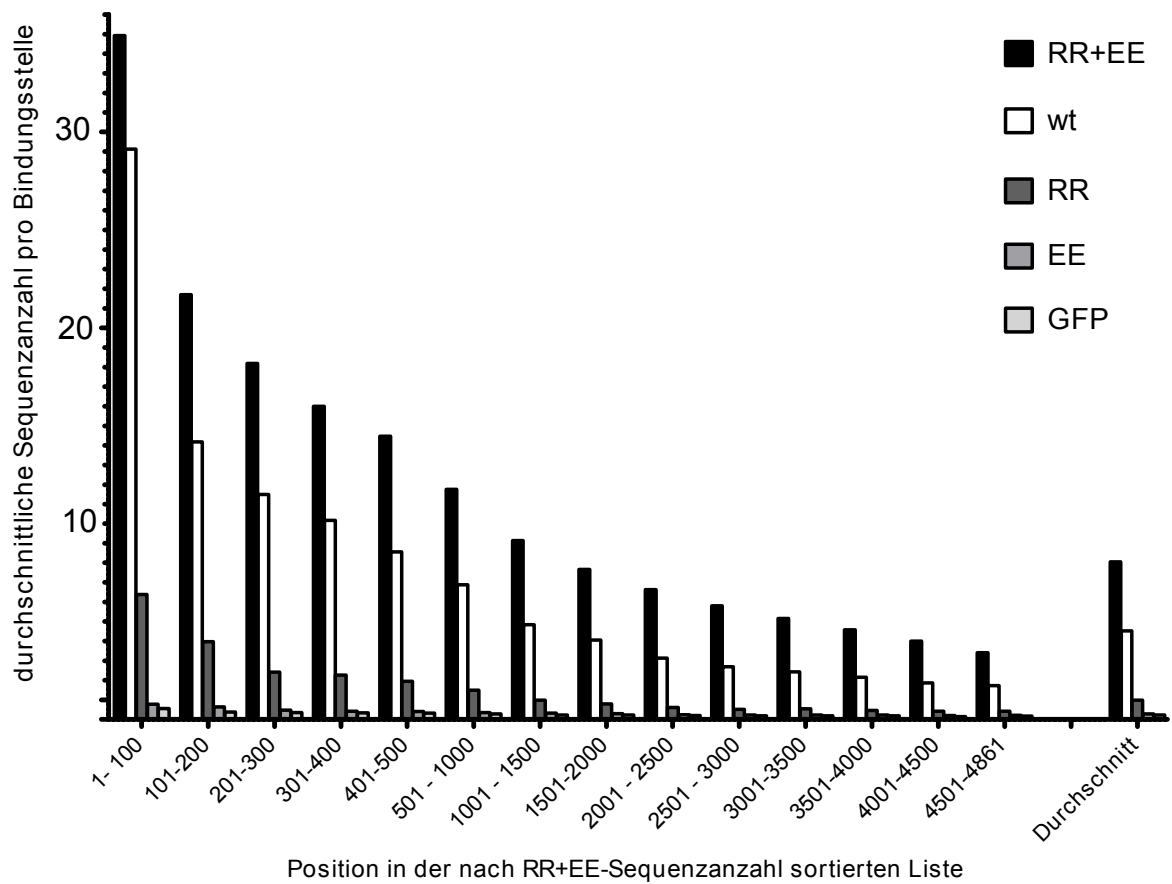


Fig. 3.6: Durchschnittliche Sequenzanzahl/BS der p53-Mutanten im Vergleich. Alle BS wurden nach RR+EE-Sequenzanzahl absteigend sortiert und anschließend die jeweilige durchschnittliche Sequenzanzahl pro BS in Gruppen von 100 bzw. 500 BS ermittelt. Die Sequenzanzahlen/BS der unterschiedlichen p53-Mutanten stehen in relativ konstantem Verhältnis zueinander.

stark kooperatives p53 stärker an die DNA bindet als schwächer kooperatives p53.

Neben diesem Zusammenhang von Sequenzanzahl/BS und Kooperativität variierte die Sequenzanzahl/BS auch unabhängig von der Kooperativität der jeweils bindenden p53-Mutanten für unterschiedliche BS. Die Verhältnisse der Sequenzanzahlen der unterschiedlichen p53-Varianten an einer BS waren dabei sowohl an stärker als auch an schwächer gebundenen BS durchschnittlich relativ konstant zueinander (siehe Abb. 3.6). Diese Beobachtung lässt die Schlußfolgerung zu, dass eine Reihe von BS-spezifischen Faktoren die Affinität von p53-Bindungsstellen und damit die Bindungsstärke von p53 an der jeweiligen BS beeinflussen können.

Um die verschiedenen p53-Mutanten hinsichtlich ihres Bindungsverhaltens und ihres Zielgenspektrums miteinander vergleichen zu können, war es entscheidend zu

ermitteln, inwiefern gemeinsame BS, also Bindung an der selben Stelle des Genoms, vorliegen. Alle gebundenen Regionen wurden daher auf eine eventuelle räumliche Überlappung mit Bindung anderer Mutanten untersucht und die Sequenzanzahlen aller Mutanten in dem jeweiligen Abschnitt ermittelt. Sämtliche BS wurden anschließend nach absteigender p53-RR+EE-Sequenzanzahl sortiert und die verschiedenen Mutanten sowie die Negativkontrollen GFP und Input hinsichtlich ihrer Sequenzanzahl verglichen (siehe Abb. 3.7). Es zeigte sich bei dieser Anordnung deutlich, dass schwach kooperative p53-Mutanten grundsätzlich an die selben DNA-Abschnitte wie stärker kooperative p53-Mutanten banden. Allerdings wies schwach kooperatives p53 in der Regel weniger Sequenzen/BS auf, band also mit einer schwächeren Bindungsstärke. Dementsprechend banden schwach kooperative Mutanten hauptsächlich an hochaffine DNA-Bereiche, in denen stark kooperative Mutanten hohe Sequenzanreicherungen zeigten, und wiesen an niedrigaffinen BS, an die stark kooperative Mutanten nur schwach binden, wenig oder keine Sequenzen auf. Folglich handelt es sich bei den BS der schwach kooperativen p53-Mutanten um eine Untergruppe der BS der stärker bindenden p53-Mutanten. Dies ermöglichte anhand der für die Bindung benötigte DNA-Bindungs Kooperativität die Einteilung in hoch-, mittel- und niedrigaffine p53-BS.

Für die in der ChIPseq untersuchten p53-Mutanten RR+EE, RR, sowie Wildtyp-p53 wurden entsprechend drei Gruppen von p53-BS definiert (siehe Abb. 3.7, sowie 3.8):

Bezeichnung	Charakterisierung
„RR+EE, wt, RR“	hochaffine Bindungsstellen , an denen RR+EE viele Sequenzen aufweist und an denen auch Wildtyp und RR signifikant binden
„RR+EE, wt“	mittelaffine Bindungsstellen , an denen sowohl RR+EE als auch Wildtyp, nicht jedoch RR signifikant gebunden sind
„nur RR+EE“	niedrigaffine Bindungsstellen , an denen RR+EE vergleichsweise wenig Sequenzen aufweist und als einzige Mutante ausreichend kooperativ ist um signifikant zu binden

Tab. 3.2: Gruppeneinteilung in hoch-, mittel- und niedrigaffine Bindungsstellen

Als „RR+EE, wt“-BS bzw „RR+EE, wt, RR“-BS wurden DNA-Bereiche gewertet, an denen mehrere p53-Mutanten einen Peak mit einer $FDR < 0,00001$ und einer normalisierten Sequenzanzahl von mindestens 3 aufwiesen.

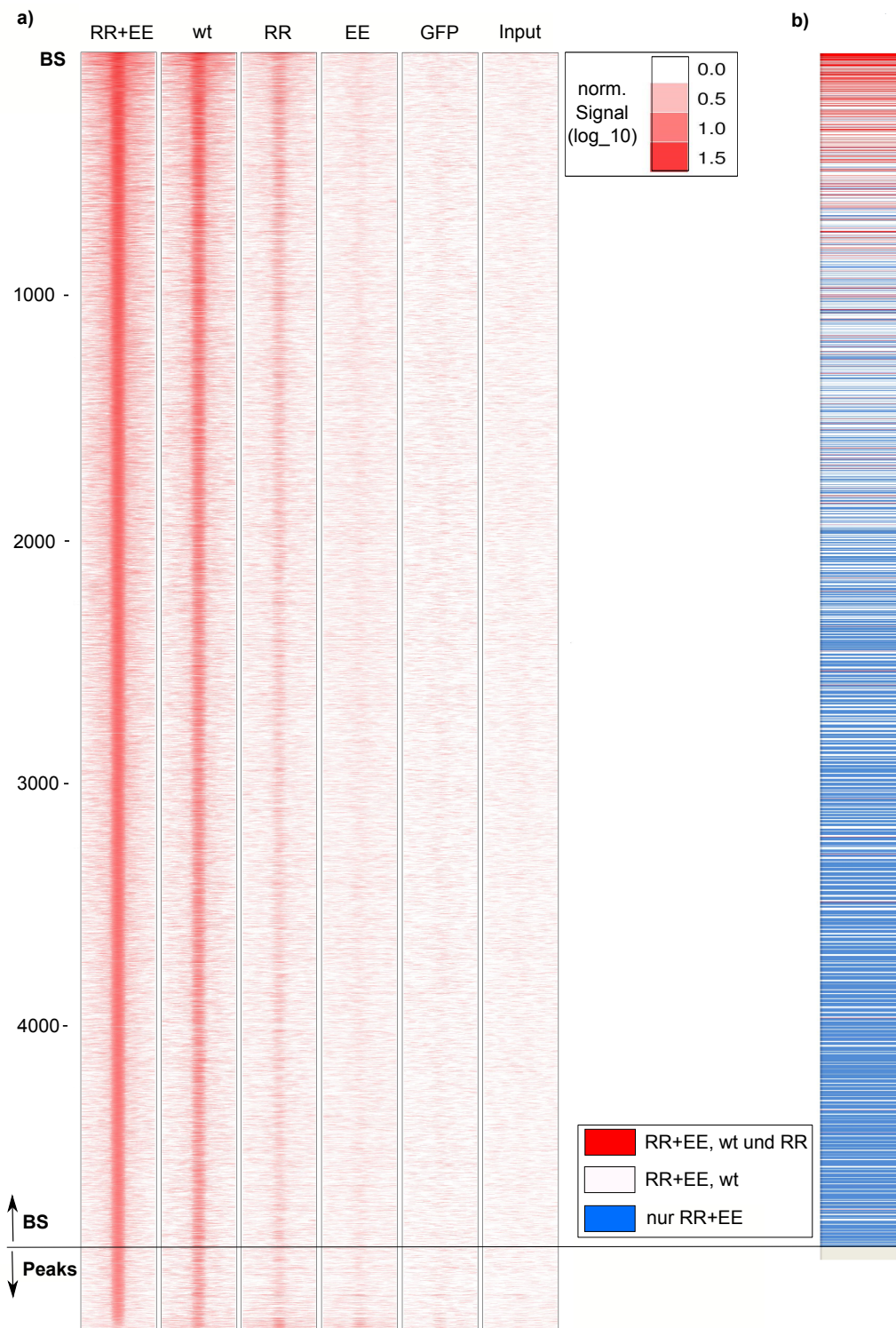


Fig. 3.7: Nach absteigender RR+EE-Sequenzanzahl geordnete BS der p53-Mutanten, p53-Wildtyp sowie GFP und Input (a). Die Farbintensität kodiert logarithmisch die Sequenzanzahl, die den jeweiligen Peak stützen; die Breite des Signals korreliert linear mit der Peakbreite. Nebenstehend Heatmap der Gruppenverteilung (b). Der Übergang von BS (über 3 normalisierte Sequenzen) zu Peaks (unter 3 normalisierte Sequenzen) ist gekennzeichnet.

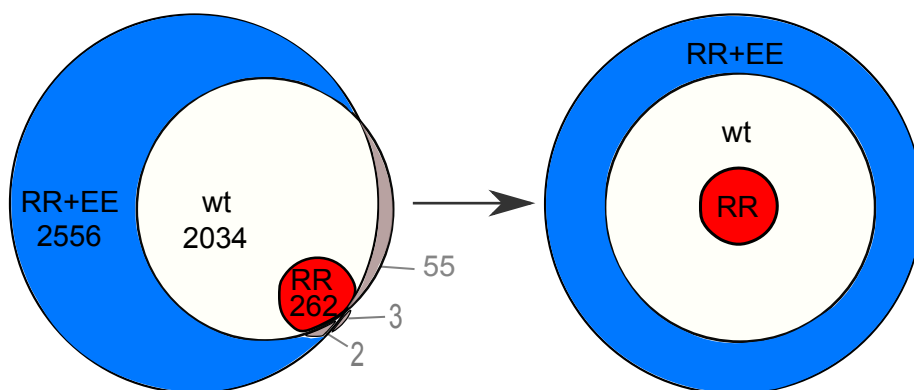


Fig. 3.8: Venndiagramm der insgesamt 4912 BS der p53-Mutanten RR+EE, Wildtyp-p53 und RR (tatsächliche Verteilung und Modell).

Nach dieser Einteilung ergaben sich 262 hochaffine „RR+EE, wt und RR“-BS, etwa achtfach mehr mittelaaffine „RR+EE, wt“-BS (2034 BS) und knapp zehnfach mehr niedrigaffine „nur RR+EE“-BS (2556 BS).

Nur wenige BS ließen sich nicht einer dieser definierten Gruppen zuteilen. Dies betraf nur 2 „RR+EE“-BS, die zusätzlich von p53-RR, nicht aber von Wildtyp-p53 gebunden werden (0,08 % der „RR+EE“-BS). 55 BS wurden hingegen von Wildtyp-p53, nicht aber von p53-RR+EE gebunden (2,7 % der „Wildtyp“-BS) und 5 RR-BS wurden nicht von Wildtyp-p53 besetzt (1,9 % der „RR“-BS) (siehe Abb. 3.8). Für die folgenden Analysen wurden daher, soweit nicht anders angegeben, p53-BS in diese definierten Gruppen eingeteilt.

Neben spezifischer Bindung von p53 an die DNA findet sich unspezifische Bindung

Bei der Anordnung der p53-BS nach RR+EE-Sequenzanzahl fiel auf, dass die Sequenzanzahlen/BS der schwach bindenden p53-Mutanten RR und EE etwa im Bereich der einhundert Peaks mit der geringsten RR+EE-Sequenzanzahl (<3 normalisierte Sequenzen, daher keine signifikant gebundenen RR+EE-BS) deutlich zunahmen. Das Farbsignal aller vier p53-Mutanten besaß in diesem Bereich eine sehr ähnliche Intensität; alle vier Mutanten banden also unabhängig von ihrer Kooperativität ähnlich stark an diese Bereiche der DNA (siehe Abb. 3.7 sowie Abb. 6.8 im Anhang).

Diese Beobachtung bestätigten sich im Vergleich der Sequenzanzahlen/BS von 100 zufällig ausgewählten p53-BS und den letzten 100 Peaks (siehe Abb. 3.9). So zeigten

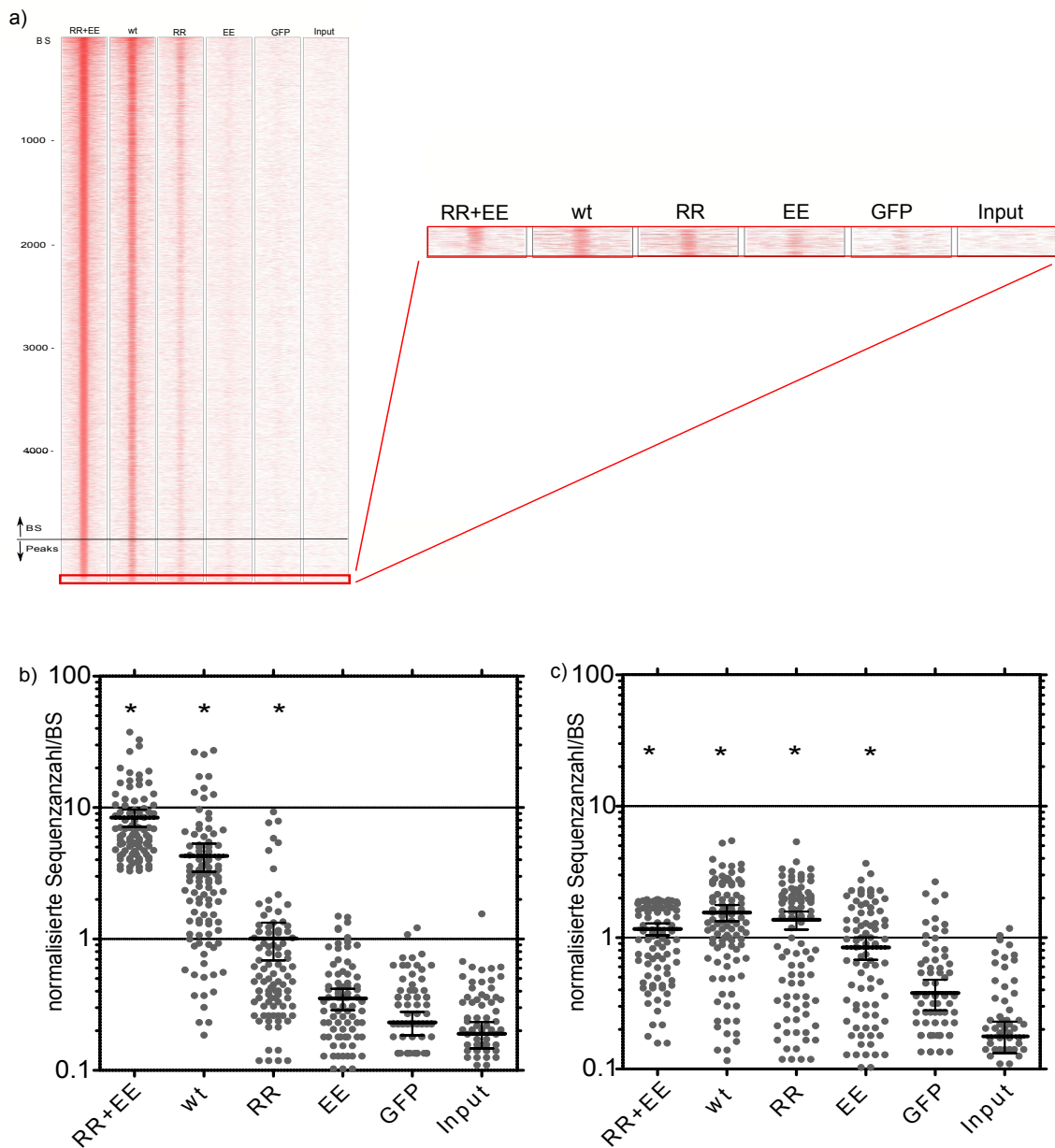


Fig. 3.9: Im Bereich der schwächsten gebundenen 100 Peaks weisen Wildtyp-p53, sowie alle Helix-Mutanten, inklusive p53-EE, ähnliche Sequenzzahlen/BS auf (a). Normalisierte Sequenzzahlen an 100 zufällig ausgewählten BS (b) vs. an den 100 Peaks mit den geringsten RR+EE-Sequenzanzahlen (c). Durchgeführt wurden ein Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn's Multiple Comparison Test. Darstellung mit Mittelwert und 95% -Konfidenzintervall. Mit Sternchen markiert jeweils die Gruppen, deren Mittelwerte signifikant ($p < 0,05$) vom Mittelwert der Negativkontrollen GFP und Input abweichen.

bei 100 zufällig ausgewählten p53-BS p53-RR+EE, Wildtyp-p53, sowie p53-RR einen signifikanten Unterschied des Mittelwertes gegen die Negativkontrollen Input und GFP (markiert mit Sternchen). Der Mittelwert der EE-Sequenzanzahlen hingegen unterschied sich nicht signifikant von den Negativkontrollen. Für p53-EE lag also keine signifikante Bindung vor, was sich mit den Ergebnissen der ChIP-qPCR deckt. Die letzten 100 Peaks zeigten hingegen ein deutlich anderes Bindungsverhalten. Auffällig war, dass sich die zuvor deutlich ausgeprägten Unterschiede in der durchschnittlichen Sequenzanzahl/BS der Mutanten an den letzten 100 Positionen beinahe vollständig nivelliert hatten - Wildtyp-p53 und die p53-Mutanten banden also nahezu mit gleicher Bindungsstärke. Zusätzlich zeigte die p53-Mutante EE an den letzten 100 Peaks im Gegensatz zu 100 zufällig ausgewählten p53-BS einen signifikanten Unterschied des Sequenzanzahl/BS-Mittelwerts zu den Negativkontrollen.

Die Motivanalyse mit MEME und TOMTOM ergab, dass das typische p53-Motiv an nahezu allen der 100 zufällig ausgewählten BS vorlag (99/100), an den letzten 100 Peaks allerdings nicht einmal in der Hälfte der Fälle (41/100). Untersucht wurden daraufhin in dieser Gruppe gezielt die Peaks, an denen p53-EE eine deutlich erhöhte Sequenzanzahl aufwies (Mindestsequenzanzahl von 1 norm. Sequenz, entsprechend 39 nichtnormalisierten Sequenzen). In dieser Gruppe von Peaks lag das p53-Motiv jedoch nicht vor. Es ist also davon auszugehen, dass es sich bei diesen Peaks um eine unspezifische Bindung handelt, die unabhängig von der zentralen DNA-Bindungsdomäne und damit kooperativitätsunabhängig stattfindet.

3.1.2 Die Kooperativität beeinflusst die Bindung an das p53-Motiv

Für die Rolle von p53 als Transkriptionsfaktor ist die Bindung an die DNA von essentieller Bedeutung. Ein wesentlicher Aspekt dieser Bindung ist das Vorliegen von relativ konservierten Bindungsmotiven im Bereich der BS. Die im Zuge dieser Arbeit identifizierten BS wurden daher auf das Auftreten von angereicherten Motiven hin untersucht. Um eine Aussage über den Zusammenhang des Vorliegen eines Bindungsmotivs und der Bindung von p53 treffen zu können, wurden alle Analysen für die drei definierten BS-Gruppen durchgeführt (siehe Tab. 3.2 sowie Abb. 3.8).

Mithilfe des MEME-Algorithmus wurden zunächst de-novo Motive in allen drei Gruppen von BS ermittelt. Hierbei wurden zufällig aus jeder Gruppe je 200 p53-BS untersucht. Es konnten zwei Motive unterschiedlicher Länge identifiziert werden (siehe Abb. 3.10). Das längere Motive lag in allen drei Gruppen an sämtlichen 200 BS vor. Das kürzere Motiv trat in der Gruppe der „nur RR+EE“-BS an allen 200 BS auf, in den beiden anderen Gruppen an 199 BS.

Durch TOMTOM wurde die Ähnlichkeit der identifizierten de-novo-Motive mit bekannten Bindungsmotiven ermittelt. Sowohl für das längere als auch für das kürzere Motiv ergab sich dabei für alle drei Gruppen eine hochsignifikante Übereinstimmung mit dem bekannten p53-Bindungsmotiv (siehe Tab. 3.3). Es handelt sich bei dem längeren Motiv um das volle p53-Motiv, bei dem kürzeren Motiv um das p53-Halbmotiv.

Gruppe	P-Wert p53-Vollmotiv	P-Wert p53-Halbmotiv
nur RR+EE	$5,5 \times 10^{-8}$	$6,5 \times 10^{-8}$
RR+EE, wt	$6,6 \times 10^{-9}$	$1,2 \times 10^{-6}$
RR+EE, wt, RR	$6,2 \times 10^{-10}$	$3,2 \times 10^{-6}$

Tab. 3.3: P-Werte der Übereinstimmung der identifizierten de-novo-Motive mit dem p53-Voll- und Halbmotiv.

Aufgrund dieser initialen Suche nach einem p53-Motiv konnte bestätigt werden, dass

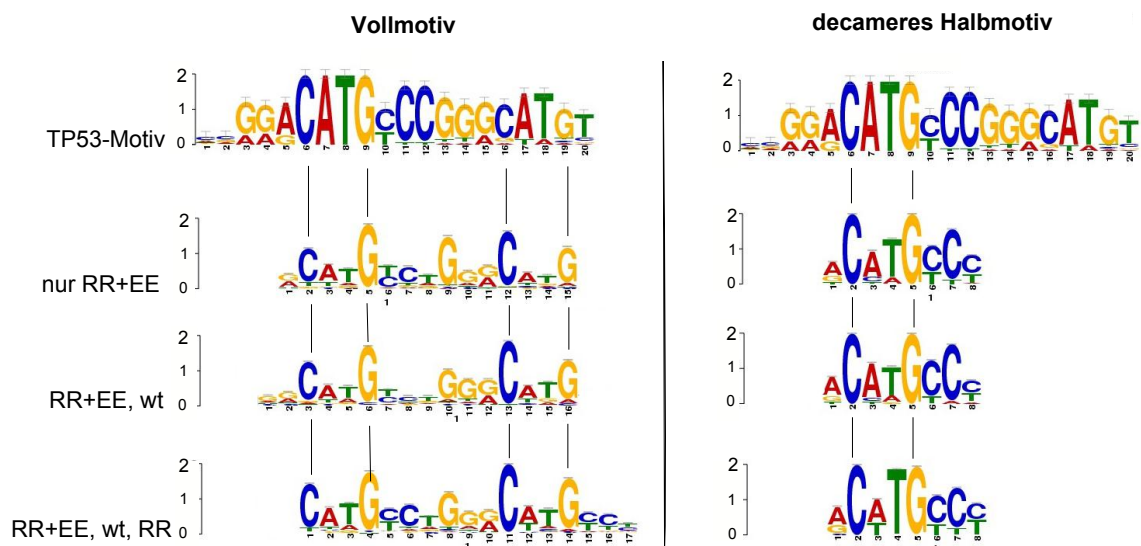


Fig. 3.10: Die mit MEME ermittelten de-novo Motive der drei BS-Gruppen im Vergleich mit dem TP53-Motiv (JASPAR-Datenbank). Vollmotiv links, decamerer Halbmotiv rechts.

es sich bei allen identifizierten BS mit sehr großer Wahrscheinlichkeit um tatsächliche p53-BS handelt. Jedoch zeigte sich hierbei keine von der DNA-Bindungs Kooperativität abhängige differenzierte Motivkomposition. Ein in diesem Zusammenhang zu berücksichtigender Aspekt war die überaus stringente Filterung der untersuchten BS mit einer niedrigen FDR sowie einer hohen Mindestsequenzanzahl. Durch diese strengen Grundeinstellungen wurden nur höchstsignifikant gebundene DNA-Bereiche als BS identifiziert, was die falsch positive Rate minimierte, allerdings die Differenzierung zwischen den identifizierten BS erschwerte.

Um eine bessere Differenzierung zwischen den zu untersuchenden p53-Gruppen zu gewährleisten, wurde daher eine weitere Analyseform gewählt. Durch „Receiver Operating Characteristics“ (ROC)-Analysen sollte untersucht werden, inwiefern an p53-BS das p53-Bindungsmotiv im Vergleich zu zufällig gewählten Sequenzen von gleicher Länge angereichert vorliegt.

Bei ROC-Kurven handelt es sich um eine Darstellungsform, bei der die „Falsch Negative Rate“ (FNR) gegen die „Falsch positive Rate“ (FPR) aufgetragen wird. Eine Kurve nahe der Diagonalen deutet dabei auf eine zufällige Verteilung hin, bei der die Trefferquote der Falsch Positiven Rate entspricht. Ein Parameter für den Anstieg der ROC-Kurve ist die Fläche unter der Kurve (Area under the Curve, AUC). Je größer dieser AUC-Wert, der üblicherweise einen Wert zwischen 0,5 und 1 annimmt, desto wahrscheinlicher liegt eine Anreicherung vor.

Für die BS der drei zuvor definierten Gruppen („nur RR+EE“; „RR+EE, wt“; „RR+EE, wt, RR“) wurden eine Reihe von ROC-Analysen durchgeführt und die AUC bestimmt (siehe Abb. 3.11 und 3.12). Dabei wurden die Gruppen „nur RR+EE“ sowie „RR+EE, wt“ auf 262 randomisierte BS eingeschränkt, um eine Vergleichbarkeit der Gruppen untereinander sicherzustellen. Neben dem kanonischen p53-Motiv wurde das p53-Halbmotiv, mehrere Mutationen des Vollmotivs und das Vollmotiv unter Einfügen unterschiedlich langer Spacer getestet. Es zeigte sich, dass das p53-Voll- und Halbmotiv, sowie ein Teil der getesteten Varianten und Spacervariationen in allen drei BS-Gruppen mehr oder weniger stark angereichert vorlagen. Die hochaffinen BS der Gruppe „RR+EE, wt, RR“, wiesen durchweg die höchste Motivanreicherung auf. Niedrigaffine BS („nur RR+EE“), zeigten eine deutlich geringere Anreicherung der untersuchten p53-Motive. So beträgt die AUC des kanonischen p53-Motivs für

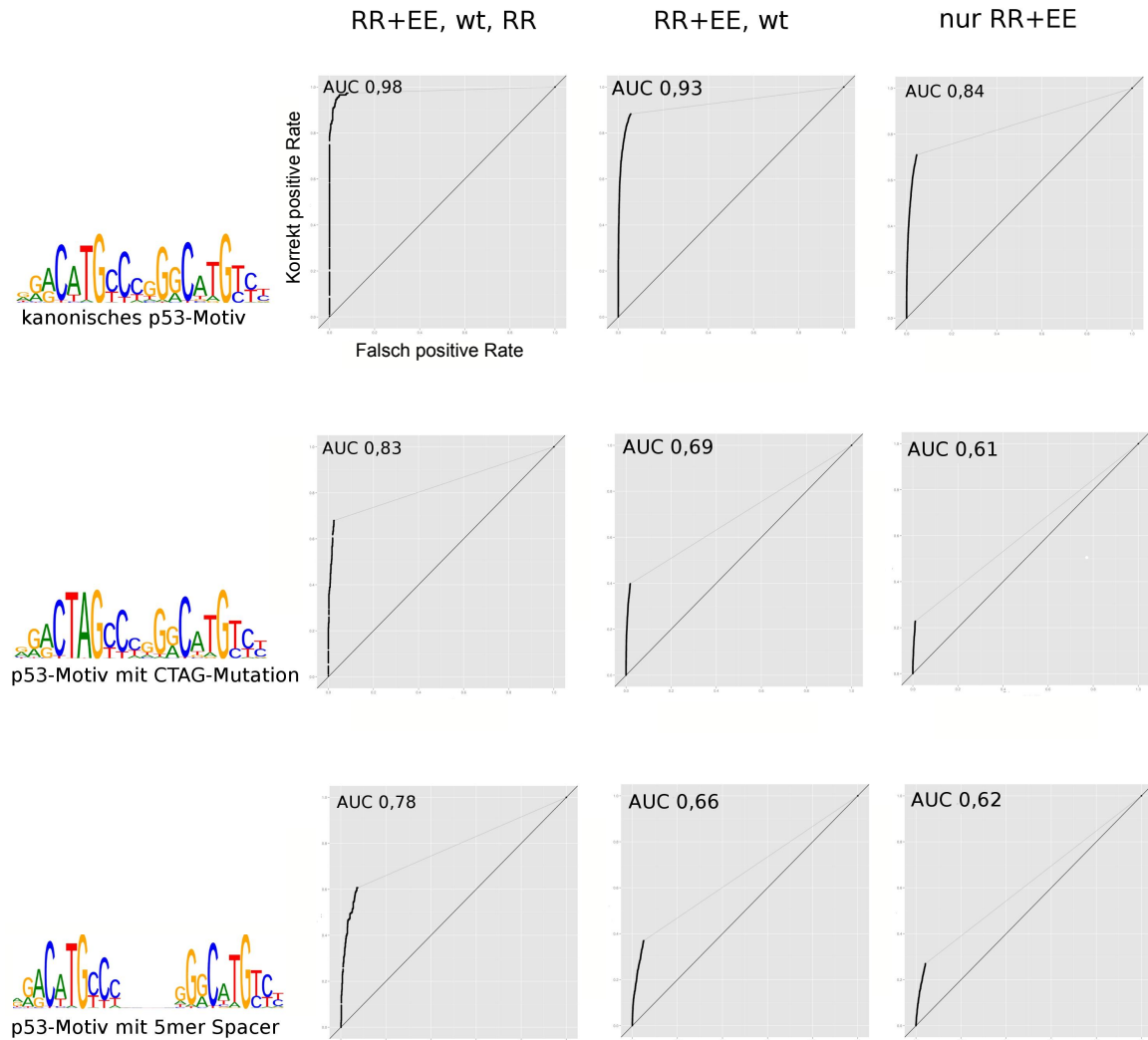


Fig. 3.11: ROC-Kurven des kanonischen p53-Bindungsmotivs (oben), bei Variation des Motivs an Base 5 und 6 (Mitte), sowie bei Einfügen eines Spacers (unten). Je konservierter eine Base vorliegt, desto höher ist sie in der Grafik dargestellt. Bei dem kanonischen p53-Motiv ist eine gewisse Variabilität der einzelnen Basen berücksichtigt. Je steiler die ROC-Kurve ansteigt und umso höher der AUC-Wert, desto stärker angereichert liegt das jeweilige Motiv vor. Das kanonische p53-Motiv ist also besonders an BS der Gruppe „RR+EE, wt, RR“ angereichert. Diese Anreicherung nimmt bei der Variierung zu CTAG oder bei Einfügen eines Spacers deutlich ab. An niedrigaffinen BS der Gruppe „nur RR+EE“ liegen die Motive weniger angereichert vor.

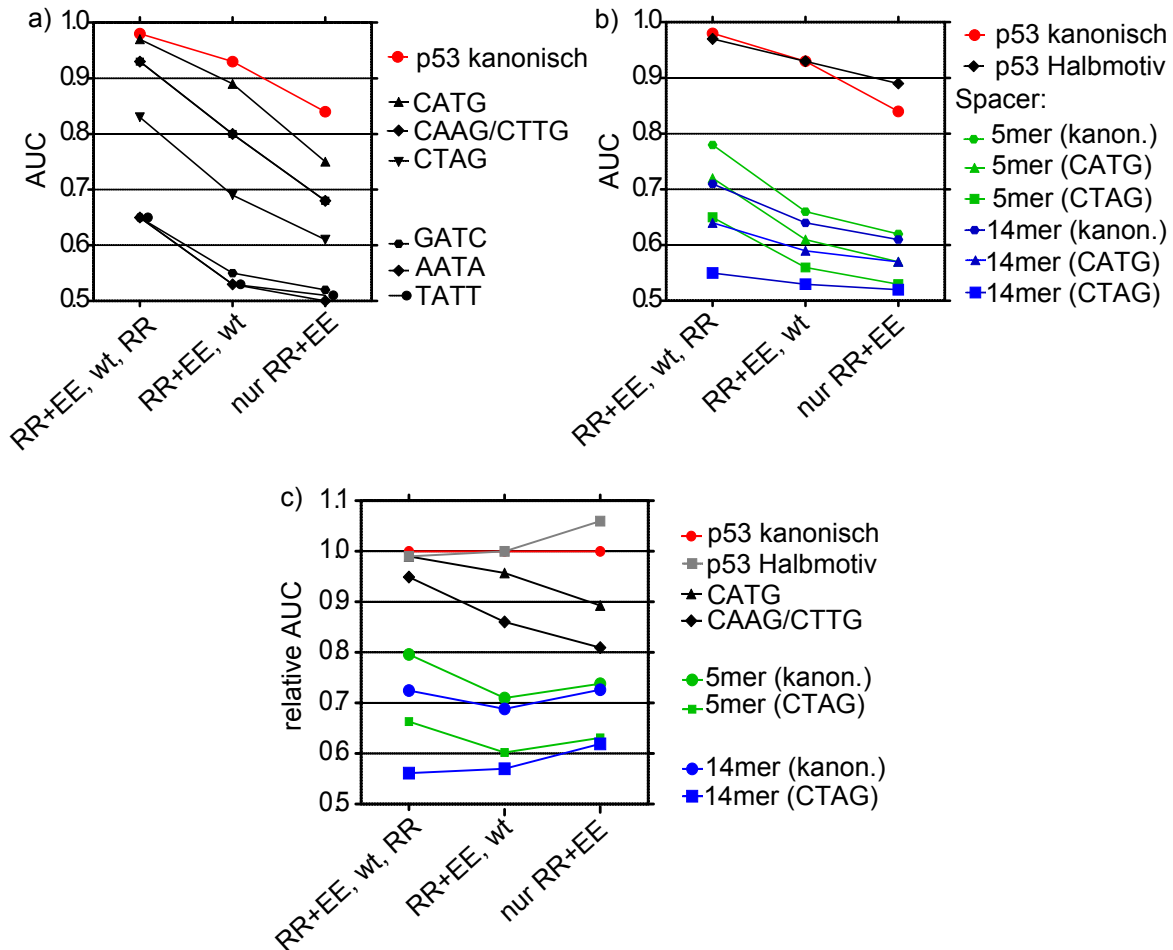


Fig. 3.12: Übersicht über die AUCs der durchgeführten ROC-Analysen. Vergleich des kanonischen p53-Motivs mit p53-Vollmotiven unter Veränderung des zentralen CATGs (a), sowie mit dem p53-Halbmotiv und nach Einfügen eines Spacers in das p53-Vollmotiv (b). Relative AUC-Werte, bezogen auf die AUC des kanonischen p53-Motivs (c). Je größer die absolute AUC, desto stärker ist das Motiv angereichert. Je größer die relative AUC, desto größer die Anreicherung des jeweiligen Motivs im Verhältnis zu der Anreicherung des kanonischen p53-Motivs.

„RR+EE, wt, RR“ 0,98, hingegen für „nur RR+EE“ nur 0,84 - das Motiv liegt in der zweiten Gruppe also an wesentlich weniger Bindungsstellen vor.

Zusätzlich zu dem kanonischen p53-Motiv, das bereits eine gewisse Variabilität der Nukleinsäuren an bestimmten Positionen berücksichtigt, wurden mehrere Motivvarianten des kanonischen Motivs untersucht. Die Analysen dieser Varianten zeigten eine deutliche Abnahme der Motivanreicherung bei abnehmender Affinität, jeweils abhängig von Position und Variation der Nukleinsäure. Auffällig war der Unterschied zwischen der Mutation einer der üblicherweise sehr konserviert vorliegenden Nukleinsäurebasen Cytosin und Guanin an Position 4 und 7 bzw 14 und 17, sowie der weniger konservierten Nukleinsäuren Adenin und Thymin an Position 5 und 6 bzw 15 und 16. So führte ersteres deutlich ausgeprägter zur Abnahme der Motivhäufigkeit an sämtlichen untersuchten BS. Die beiden flankierenden Positionen Guanin und Cytosin sind für die spezifische Bindung von p53 also deutlich entscheidender als die zwischenliegenden Nukleinsäuren Alanin und Thymin (siehe Abb. 3.12a).

Ebenfalls wurde in den ROC-Kurven der Effekt eines zusätzlichen Spacers im p53-Vollmotiv beziehungsweise das Vorliegen des p53-Halbmotivs untersucht. Insbesondere war auffällig, dass das p53-Halbmotiv an niedrigaffinen BS („nur RR+EE“) häufiger vorlag als das p53-Vollmotiv. Auch bei Einfügen zusätzlicher Spacers, insbesondere des 14mer Spacers, fiel auf, dass die Differenz zwischen der Anreicherung in den hochaffinen BS („RR+EE, wt,RR“) und den niedrigaffinen BS („nur RR+EE“) deutlich geringer war als beim p53-Vollmotiv. Deutlich wurde dies etwa bei dem in Abb. 3.12 b) dargestellten flacheren Kurvenverlauf der 14mer-Spacer-Kurve (blau) im Gegensatz zu dem steileren Abfall der Kurve des kanonischen p53-Motivs (rot).

Zusammenfassend bestätigten die vorgestellten Daten die motivabhängige Bindung von p53 an die DNA. Dabei bindet schwach kooperatives p53-RR in erster Linie an hochaffine p53-BS, die die p53-Konsensussequenz in reiner oder nur leicht variiert Form, etwa durch Veränderung eines Basenpaares, aufweisen. Die hochkooperative p53-Mutante RR+EE ist hingegen besser in der Lage trotz Vorliegen des halben p53-Bindungsmotivs oder im Fall von Spacerelementen zu binden, welche sich eher an niedrigaffinen BS finden. Hochkooperatives p53 weist folglich eine höhere „Fehlertoleranz“ auf und besitzt somit ein größeres Spektrum an möglichen BS.

3.1.3 Die Kooperativität hat Einfluß auf das Zielgenspektrum

So vielfältig die unterschiedlichen Funktionsmuster und Reaktionen von p53 auf verschiedene Stimuli sind, so breit ist auch das Spektrum an gebundenen Zielgenen. In dieser Arbeit lag daher ein weiterer Schwerpunkt auf der Untersuchung des Einflusses der Kooperativität auf der Wahl und Bindung der p53-Zielgene.

Gut untersuchte und wichtige Zielgene von p53 sind Gene der Apoptoseregulation, der DNA-Reparatur und des Zellzyklusarrestes. Eine Auswahl von Genen dieser Bereiche wurden anhand der Sequenzanzahl der dem Gen zugehörigen BS absteigend sortiert und nach der jeweiligen BS-Gruppe eingeteilt (siehe Abb. 3.13 sowie Abb. 6.9 im Anhang der Arbeit). Dabei fielen deutliche Unterschiede zwischen Genen der Apoptose und des Zellzyklusarrestes ins Auge. So waren die Zielgene des Zellzyklusarrestes und der DNA-Reparatur hauptsächlich im Bereich der hochaffinen BS angesiedelt. Entsprechend wurden diese Gene nicht nur durch die stark kooperative p53-Mutante RR+EE, sondern in vielen Fällen auch durch Wildtyp-p53 (sechs von neun Zellzyklusarrestgene und drei von acht DNA-Reparaturgenen) sowie häufig auch von der deutlich schwächer kooperativen p53-Mutante RR (drei von neun Zellzyklusarrestgenen und fünf von acht DNA-Reparaturgenen) gebunden. Keines der untersuchten Zellzyklusarrest- oder DNA-Reparaturgene wurde ausschließlich durch p53-RR+EE gebunden.

Anders stellte es sich für die Gene aus dem Bereich der Apoptose dar. Fünf von 25 proapoptotischen (zwei von acht antiapoptotischen) Genen wiesen analog zu den Genen des Zellzyklusarrestes und der DNA-Reparatur hochaffine BS auf, welche von allen drei untersuchten p53-Varianten gebunden wurden. Zusätzlich besaßen zehn von 25 proapoptotischen Genen (ein antiapoptotisches Gen) mittelaffine BS, die nicht von der schwach kooperativen p53-Mutante RR gebunden wurden und zehn proapoptotische (fünf antiapoptotische) Gene niedrigaffine BS, welche nur von der besonders stark kooperativen p53-Mutante RR+EE gebunden wurden. Die Bindung dieser Apoptosegene mit niedrig- oder mittelaffiner BS wird also nur durch eine hohe Kooperativität von p53 ermöglicht.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich mit zunehmender Kooperativität das Spektrum der gebundenen Apoptosegene deutlich auf Gene mit niedrigaffiner

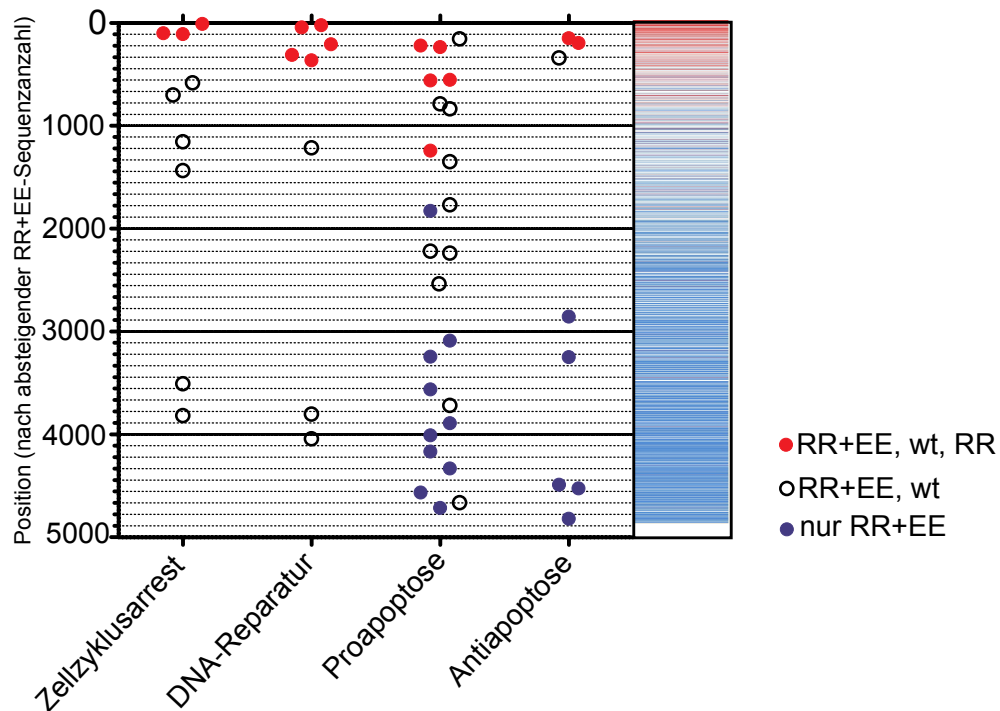


Fig. 3.13: Darstellung wichtiger regulatorischer Apoptose- und Zellzyklusarrestgene mit Einordnung in Kooperativitätsgruppe, sowie Positionierung in der nach absteigender RR+EE-Sequenzanzahl geordneten BS-Liste. Jeder Punkt entspricht einem untersuchten Gen, eine Zuordnung der zugehörigen Gennamen findet sich im Anhang der Arbeit. Nebstehend Heatmap der Gruppenverteilung aller identifizierter BS.

BS vergrößert, während ein Großteil der Zellzyklusarrest- oder DNA-Reparaturgene hochaffine BS besitzt und bereits durch schwachkooperatives p53 gebunden wird.

Um besser abschätzen zu können, welche Gene BS mit hoher bzw niedriger Affinität besitzen, wurde zusätzlich eine Gene Set Enrichment-Analyse (GSEA) durchgeführt (siehe Abb. 3.14 sowie Tab. 3.4). Ursprünglich für die Auswertung von Microarraydaten entwickelt, kann mithilfe der GSEA untersucht werden, ob in dem zu untersuchenden Expressionsdatensatz ein a-priori definiertes Genset signifikant angereichert vorliegt. In einem Genset werden verschiedene Gene, die beispielsweise eine gemeinsame oder ähnliche biologische Funktion besitzen, zusammengefasst. Unter Berücksichtigung der Korrelation von Expressionsdatensatz und Genset, sowie der Größe des Gensets, wird der normalisierte EnrichmentScore (nES) ermittelt, der es ermöglicht die Anreicherung des Expressionsdatensatzes in unterschiedlicher Gensets untereinander zu vergleichen. Um eine Aussage über die Anreicherung unterschiedlicher Gensets bei verschiedener

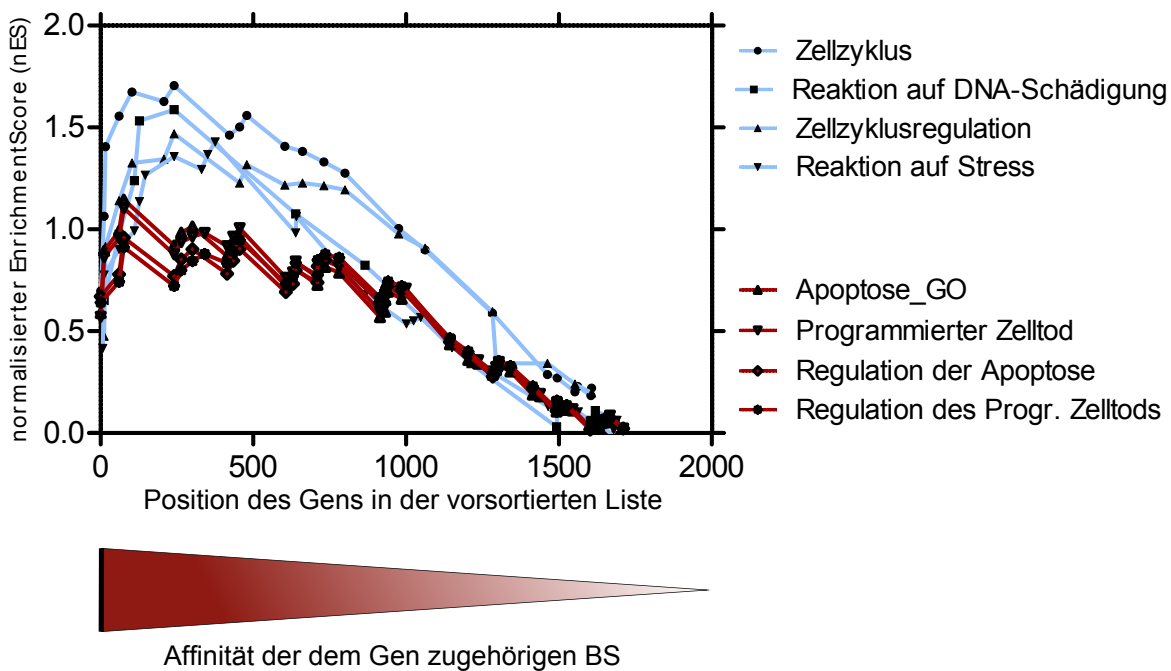


Fig. 3.14: Gen Set Enrichment-Analyse (GSEA) der nach RR+EE-Sequenzanzahl absteigend geordneten Genliste. Unter Berücksichtigung der Korrelation von Gensets und Expressionsdatensets, sowie der Größe des untersuchten Gensets ergibt sich der „normalisierte EnrichmentScore“ (nES). Gene der Zellzyklusregulation (hellblau) im Vergleich mit Genen der Apoptoseregulation (rot). Für jedes Gen eines Gensets, das sich in der sortierten Liste findet, wird der Summenindex erhöht; für jedes nicht gefundene Gen hingegen erniedrigt. Ein steiler Anstieg deutet auf eine Anreicherung der Gene der untersuchten Gensets zu Beginn der Liste hin, ein flacherer Kurvenverlauf auf eine gleichmäßigere Verteilung der Gene.

DNA-Bindungs Kooperativität von p53 treffen zu können, wurde eine Liste der Gene erstellt, für die in der ChIPseq eine p53-BS identifiziert werden konnte. Die Sortierung der Liste erfolgte nach absteigender p53-RR+EE-Sequenzanzahl der zugehörigen BS. Zu Beginn der Liste wurden dementsprechend Gene mit hochaffinen BS angeordnet, an denen p53-RR+EE eine hohe Sequenzanzahl aufweist. An diesen BS kann in der Regel auch schwächer kooperatives p53 binden. Gegen Ende der Liste befanden sich Gene mit niedrigaffinen BS, an denen p53 eine hohe Kooperativität benötigt um binden zu können. Mittels der GSEA konnte diese vorsortierte Liste auf eine Anreicherung unterschiedlicher vordefinierter Gensets hin untersucht werden. Im Vergleich der GSEA-Analysen von Gensets der Apoptose und der Zellzyklusregulation (siehe Abb. 3.14), fiel auf, dass sich die Kurvenverläufe deutlich unterschiedlich darstellten. So zeigten etwa die Kurven der Zellzyklusarrestgensets einen zunächst rasch ansteigende und dann langsam abfallende Verlauf mit einem vergleichsweise hohen maximalen

nES. Die Kurven der Apoptosets wiesen hingegen deutlich flachere Kurvenverläufe auf. Die Form resultiert aus unterschiedlicher Anreicherung der Gene des jeweils untersuchten Gensets innerhalb der nach p53-RR+EE-Sequenzanzahl vorsortierten Genliste. Initial steilere ansteigende Kurven mit höherem Maximum deuten dabei auf eine deutliche Anreicherung des Gensets zu Beginn der vorsortierten Genliste hin, flachere Kurvenverläufe resultieren hingegen aus einer gleichmäßigen Verteilung der Gene des Gensets innerhalb der vorsortierten Liste. Es lässt sich schlußfolgern, dass Gene der Zellzyklusarrestgensets eher hochaffine BS besitzen, an die auch schwach kooperatives p53 binden kann. Die gleichmäßiger über die Liste verteilten Gene des Apoptosets umfassen hingegen neben hochaffinen p53-BS auch niedrigaffine BS, für deren Bindung eine stärkere Kooperativität der H1-Helix von p53 erforderlich ist.

Neben Genen der Apoptose und der Zellzyklusregulation wurden in der GSEA auch weitere Gensets unterschiedlicher biologischer Funktion auf eine Anreicherung in der Liste der p53-Zielgene hin untersucht. Unter den angereicherten Gensets befinden sich neben solchen mit typischen p53-Funktionen wie Apoptose und Zellzyklusarrest auch Gensets im Zusammenhang mit Lipidstoffwechselprozessen, anatomischer Morphogenese und Prozessen des neurologischen Systems (siehe Tab. 4.4). Dies ist ein Hinweis darauf, dass p53 neben seiner bekannten Rolle als „Wächter des Genoms“ auch auf zahlreiche weitere metabolische Prozesse Einfluß hat.

Die durchgeführten Analysen zeigten zusammenfassend, dass für die Bindung von Zellzyklusarrestgenen in der Regel eine geringe p53-Kooperativität ausreicht, während für die Bindung zahlreicher Apoptosene eine höhere Kooperativität notwendig ist. Mit zunehmender Kooperativität steigt also nicht nur die Anzahl der gebundenen Gene, sondern es wird darüber hinaus das Spektrum der gebundenen Gene auf zahlreiche Gene der Apoptoseregulation erweitert. Desweiteren wird eine große Vielfalt weiterer Gene im Zusammenhang mit unterschiedlichsten zellbiologischen Prozessen gebunden.

GO-Terminus	Größe (Anzahl Gene)	max. nES
Zellzyklus	24	1,68
Reaktion auf DNA-Schädigung	25	1,6
Zellzyklusregulation	18	1,48
Reaktion auf Stress	36	1,43
Lipidmetabolische Prozesse	26	1,39
Zelluläre lipidmetabolische Prozesse	73	1,37
Neurologische Systemprozesse	19	1,36
Interzelluläre Signale	18	1,27
Positive Regulation von Entwicklungsprozessen	20	1,2
Anatomische Strukturmorphogenese	28	1,19
Apoptose	44	1,13
Programmierter Zelltod	45	1,09
Zellentwicklung	56	1,05
Anatomische Strukturentwicklung	70	1,05
Regulation der Apoptose	37	0,97
Regulation des programmierten Zelltods	38	0,96

Tab. 3.4: Auswahl in der GSEA-Analyse angereicherter Gensets, sortiert nach maximalem normalisiertem EnrichmentScore. Ein hoher max. nES deutet auf eine hohe Anreicherung des untersuchten Genset insbesondere an Genen mit hochaffiner p53-BS hin. Neben Gensets, die mit Regulation von Zellzyklus und Apoptose zusammenhängen, sind eine Reihe weiterer unterschiedlicher Gensets angereichert, etwa Gene lipidmetabolischer Prozesse, Zellentwicklung und Morphogenese, sowie Gene im Zusammenhang mit neurologischen Systemprozessen.

3.2 Die p53-Kooperativität ist entscheidend für die Genexpression

Mithilfe der Daten aus der ChIPseq-Analyse können Aussagen über kooperativitätsabhängige Bindung von p53 an die DNA, über Bindungsmotive und die nächstliegenden Gene getroffen werden. Keinen Aufschluß geben sie allerdings zu der resultierenden Gen- oder gar Proteinexpression, die für die biologische Relevanz entscheidend sind.

Aus diesem Grunde wurden die beschriebenen ChIPseq-Ergebnisse mit entsprechenden Expressionsdaten aus Microarrayanalysen kombiniert. Die Microarrays wurden analog zu dem ChIPseq-Protokoll mit SAOS2-Zellen durchgeführt, in die über adenovirale Transfektion die p53-Mutanten RR, EE, RR+EE, sowie der Wildtyp eingebracht wurden. Nachdem über Western Blot eine gleichmäßige Proteinexpression nachgewiesen worden war, erfolgte im Anschluß an die RNA-Gewinnung die cDNA-Synthese und ein Expressionsprofiling mittels Microarray von über 47.000 Transkripten.

Die Genexpressionsdaten des Microarrays wurden den ChIPseq-BS zugeordnet (siehe Abb. 3.15). Dabei wurden alle Gene berücksichtigt, die in einer maximalen Entfernung von 10.000 bp zu einer in der ChIPseq ermittelten BS liegen. Insgesamt konnte so 1042 gebundenen Genen ein Expressionswert zugeordnet werden (darunter 642 Gene, die ausschließlich durch p53-RR+EE gebunden wurden, 352 Gene mit BS von p53-RR+EE und Wildtyp-p53, sowie 48 Gene, die durch p53-RR+EE, Wildtyp-p53 und p53-RR gebunden wurden). Als hochreguliert wurden Gene gewertet, deren mRNA-Level nach Transfektion der Zelle mit p53 im Vergleich zu p53-losen Zellen mindestens verdoppelt wurde. Analog galt für reprimierte Gene eine Reduktion der mRNAs um mindestens den Faktor zwei.

Es fiel auf, dass Gene mit hochaffinen BS durch alle drei p53-Varianten stärker in ihrer Expression hochreguliert wurden als Gene mit niedrigaffinen BS (siehe Abb. 3.15). Die Repression von Genexpression war hingegen allgemein nur sehr gering ausgeprägt.

Bie Betrachtung des Expressionsverhalten in Abhängigkeit von der Kooperativität der p53-Mutanten fielen mehr oder weniger deutlich ausgeprägte Unterschiede auf (siehe Tab. 3.5 sowie Abb. 3.16). So führten sowohl p53-RR+EE als auch Wildtyp-p53 und p53-RR zur Induktion einer Vielzahl der gebundenen Gene. Dabei induzierte die stark kooperative Mutante p53-RR+EE mit 274 Genen insgesamt deutlich mehr Gene

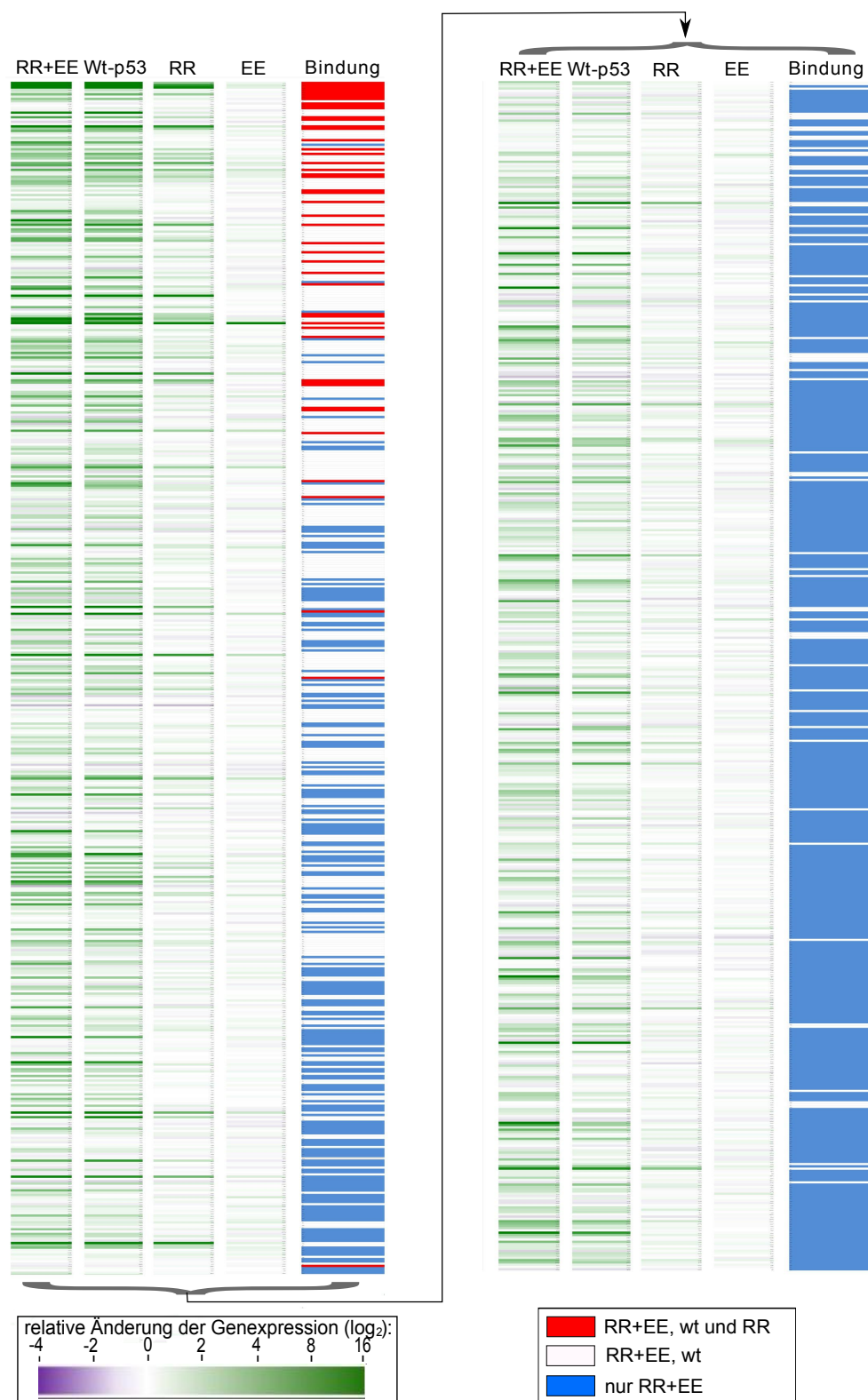


Fig. 3.15: Korrelation von ChIPseq und Expressionsdaten (maximaler Abstand von BS zu Gen 10.000 bp). Logarithmische Darstellung (log₂) von Geninduktion (grün), sowie Genreprimierung (violett). Nebstehend Gruppeneinteilung der durch ChIPseq ermittelten zugehörigen BS (RR+EE, wt, RR (rot); RR+EE, wt (weiß); nur RR+EE (blau)).

Mutante	Gebundene Gene	Induzierte Gene	Reprimierte Gene
RR+EE	1042	274	2
Wildtyp	400	200 (85)	2 (1)
RR	48	46 (18)	1 (0)
EE	0	4 (0)	0

Tab. 3.5: Anzahl der gebundenen, induzierten, sowie reprimierten Gene. Die geklammerten Werte geben an, wie viele der induzierten/reprimierten Gene eine BS der jeweiligen p53-Mutante aufweisen.

als Wildtyp-p53 (200 Gene) oder die schwach kooperative p53-Mutante RR (46 Gene). Die Reprimierung von Genen spielte hingegen nur eine untergeordnete Rolle, gerade einmal 2 Gene wurden durch p53-RR+EE sowie p53-Wildtyp, und nur 1 Gen durch p53-RR, reprimiert.

Im Gegensatz zu den 274 durch p53-RR+EE induzierten Genen, für die ausnahmslos eine zugehörige p53-RR+EE-BS nachgewiesen werden konnte, besaßen nur 18 von 46 der durch p53-RR induzierten Gene eine „RR+EE, wt, RR“-BS und 85 von 200 der durch Wildtyp-p53 induzierten Gene eine „RR+EE, wt“-BS. Ein großer Teil der übrigen RR-induzierten Gene wies eine „RR+EE und wt“-BS auf (20 Gene; Daten nicht gezeigt) und eine Minderheit eine „nur RR+EE“-BS (8 Gene; Daten nicht gezeigt). Verhältnismäßig viele der durch p53-RR gebundenen Gene wurden durch p53-RR induziert (18 Gene von 48 p53-RR-gebundenen Genen, entsprechend 37,5 %). Hingegen wurden von 1042 durch p53-RR+EE gebundenen Genen nur 274 durch p53-RR+EE auch induziert (26,3 %). Insgesamt wurde allerdings der überwiegende Teil der durch p53 gebundenen Gene in ihrer Expression nicht signifikant beeinflusst.

Diese Beobachtungen stützen die Vermutung, dass die Kooperativität der H1-Helix von p53 nicht nur für die sequenzspezifische Bindung an die DNA entscheidend ist, sondern auch für die tatsächliche Expression der Zielgene. Das Ausmaß der Kooperativität hat dabei Einfluss auf die Bindungsstärke mit der Zielgene gebunden werden und auf den Umfang der Induktion der Genexpression. Entsprechend zeigten die Genexpressionsdaten des in seiner Kooperativität deutlich eingeschränkten p53-EE analog zu den ChIPseq-Daten, nach denen es nicht nennenswert an die DNA bindet, kaum relevante Änderungen der Zielgenexpression.

Um einen genaueren Eindruck darüber zu erhalten, inwiefern sich eine Änderung der Kooperativität von p53 auf die Expression einiger wichtiger Zielgene auswirkt,

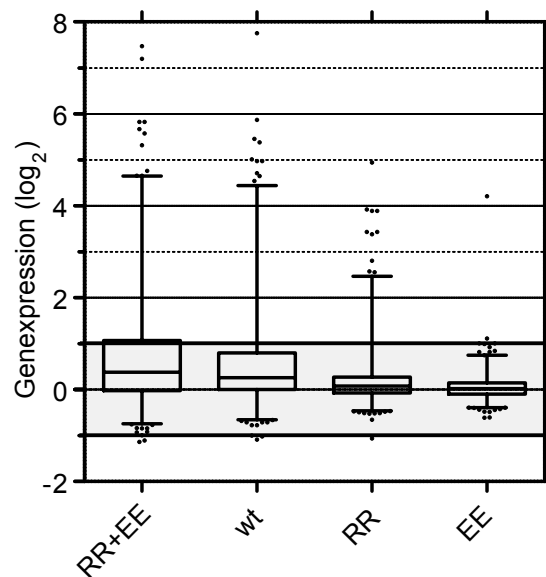


Fig. 3.16: Boxplot-Darstellung der Genexpression der durch p53 gebundenen Gene. Die vier untersuchten p53-Varianten sind bezüglich der Veränderung der Genexpression (\log_2) im Vergleich zu den p53-losen Kontrollzellen aufgetragen. Der Kasten beinhaltet 50 % der Expressionsdaten, die Linie markiert den Median. Der Balken zeigt den Bereich an, der 98 % der Werte umfasst, davon abweichende Werte sind durch Punkte markiert. Weiß hinterlegt der Bereich in dem eine differentielle Expression (mehr als zweifach erhöhte/erniedrigte Genexpression im Vergleich zu der Kontrollgruppe) festzustellen ist.

wurden die Expressionsdaten sowie die Bindungsgruppenzuteilung einiger Gene aus den Bereichen Zellzyklusarrest, DNA-Reparatur sowie Apoptose zusammengefasst (siehe Abb. 3.17 sowie Abb. 3.18). Hierbei ergab sich, dass Gene, deren BS von allen drei p53-Varianten gebunden werden, in der Regel auch von allen dreien induziert werden konnten. Allerdings zeigte sich auch hier, dass sich die Genexpressionen durch p53-RR+EE und Wildtyp-p53 nur unwesentlich voneinander unterschieden, während das schwächer kooperative p53-RR die jeweiligen Zielgene deutlich schwächer induzierte. Die kaum kooperative p53-Mutante EE zeigte so gut wie keine Induktion der Genexpression, mit der Ausnahme des Gens *TP53I3*. Dieses wurde als einziges Gen von allen p53-Mutanten, sowie durch Wildtyp-p53, auf das etwa 20-30fache des Ausgangswertes hochreguliert.

Die meisten Zellzyklusarrest- und DNA-Reparaturgene wiesen hochaffine BS auf, welche neben p53-RR+EE meist auch durch Wildtyp-p53 und häufig durch p53-RR gebunden wurden (siehe Abb. 3.18). Entsprechend wurde die Expression dieser Gene in einem Großteil der Fälle durch alle drei, wenigstens aber durch zwei p53-Varianten,

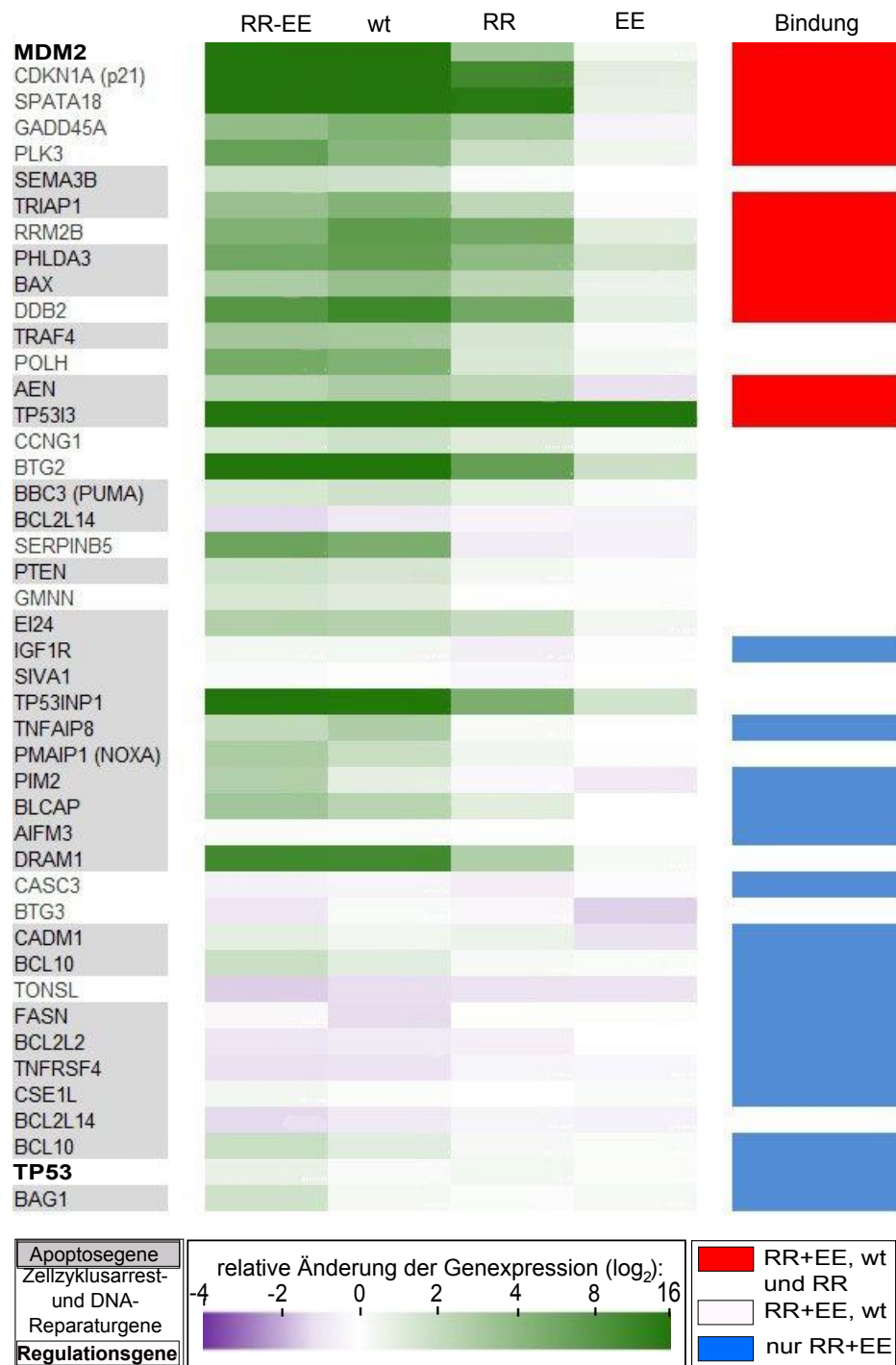


Fig. 3.17: Expression wichtiger Apoptosegene (grau unterlegt) und Zellzyklusarrest- und DNA-Reparaturgene (weiß unterlegt), sowie der regulatorischen Gene *MDM2* und *TP53* (fett gedruckt). Sortierung nach absteigender RR+EE-Sequenzanzahl der den Genen zugeordneten p53-BS. Die Heatmap zeigt Geninduktion (grün) und Genrepression (lila) durch die p53-Mutanten RR+EE, RR, EE, sowie p53-Wildtyp. Rechts das Bindungsmuster der p53-Mutanten an den jeweiligen p53-BS der ChIPseq.

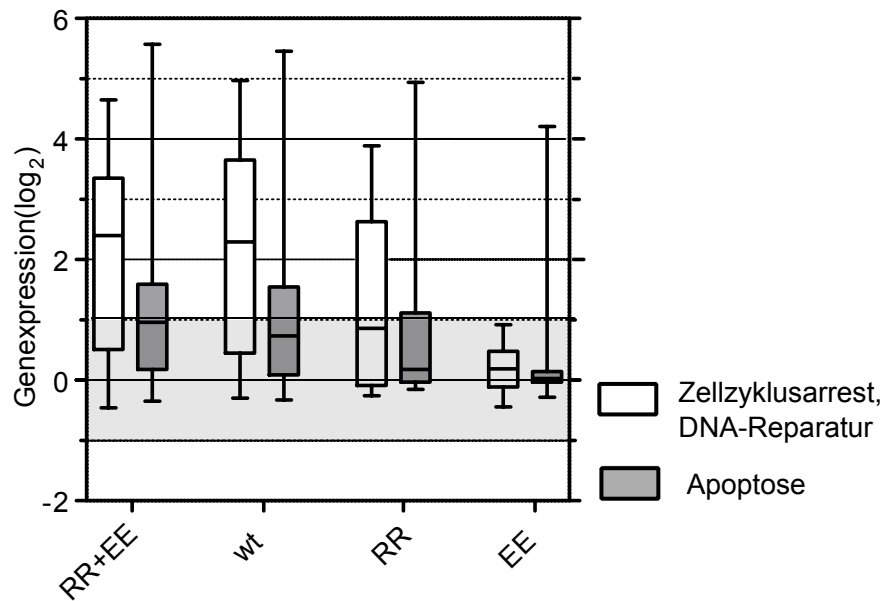


Fig. 3.18: Induktion der Genexpression wichtiger Zellzyklusarrest-, DNA-Reparatur- und Apoptosegene durch p53-Wildtyp sowie die p53-Mutanten RR+EE, RR und EE. Die Boxen umfassen 50%; die Balken 100% aller Werte. Die Linie innerhalb der Box markiert den Median.

induziert. Typische Beispiele waren etwa die Gene *CDKN1A* (p21), *GADD45A* oder *SERPINB5*. Neben einigen Apoptosegenen, die ein den Zellzyklusarrestgenen ähnliches Bindungs- und Genexpressionsverhalten zeigten (beispielsweise *BAX*, *PHLDA3* oder *TRIAP1*), besaß ein Großteil der Apoptosegene niedriger affine BS, welche deutlich schwächer und häufig ausschließlich durch die stark kooperative p53-Mutante RR+EE gebunden wurden. Entsprechend wurde die Genexpression dieser Gene nur wenig oder sogar gar nicht induziert (*BCL10*, *FASN*). Interessanterweise wurden die beiden wichtigen proapoptotischen Gene *BBC3* (PUMA) und *PMAIP1* (NOXA) beide neben p53-RR+EE auch von Wildtyp-p53 gebunden, allerdings kaum oder nur durch p53-RR+EE induziert.

Zusammengefasst zeigte die Korrelation der Daten aus ChIPseq und Microarray einen deutlichen Zusammenhang zwischen Kooperativität, Zielgenbindung und Expression. Die Daten der ChIPseq bezüglich des Bindungsverhaltens von p53 in Abhängigkeit von der Kooperativität korrelierten diesbezüglich mit den Expressionsdaten des Microarrays. Eine verstärkte Kooperativität der H1-Helix von p53 bewirkte eine Erhöhung der DNA-Bindungsstärke, ein ausgeweitetes Zielgenspektrum, beispielsweise

auf Gene der Apoptosesignalwege, und eine verstärkte Expression der Zielgene.

P53-Zielgene aus den Bereichen Zellzyklusarrest und DNA-Reparatur wiesen BS höherer Affinität auf und wurden in ihrer Expression stärker induziert als Apoptosezielgene. Wichtige Apoptosegene, wie *PMAIP1* (NOXA) oder *BBC3* (PUMA) wurden zwar bei ausreichender p53-Kooperativität gebunden, allerdings auch von stark kooperativem p53 nicht oder nur geringfügig in ihrer Expression induziert.

Hohe Kooperativität von p53 ist also Grundvoraussetzung für die Bindung gewisser Zielgene, etwa aus dem Bereich der Apoptose. Es stellt sich allerdings die Frage nach weiteren regulatorischen Mechanismen, die über die Veränderung und Kooperativität und Bindungsstärke von p53 hinausgehen und zur Induktion der Expression wichtiger p53-Zielgene entscheidend beitragen.

Kapitel 4

Diskussion

Zielsetzung dieser Arbeit war es, den Einfluss der Kooperativität der p53 H1-Helix auf DNA- und Zielgenbindung zu analysieren. Die verwendete Chromatin-Immunopräzipitation mit anschließender Sequenzierung (ChIPseq) stellt eine relativ neue Methode dar, mit der die genomweite Identifikation von p53-Bindungsstellen möglich wird. Im Vergleich mit bisher gebräuchlichen Microarray-Analysen gelingt es mit der ChIPseq eine deutlich höhere Anzahl an Bindungsstellen zu identifizieren als bislang möglich. Die Besonderheit bei der Durchführung der ChIPseq in vorliegender Arbeit lag dabei in dem Einsatz von Wildtyp-p53 sowie unterschiedlich stark kooperativen p53-Mutanten. Dies ermöglichte Analysen zu den Zusammenhängen zwischen p53-Kooperativität, DNA-Bindungsverhalten, Zielgenbindung und - in Zusammenschau mit Ergebnissen der parallel durchgeführten Microarray-Analysen - zusätzlich zur Zielgenexpression.

Es gelang in vorliegender Arbeit rund 2300 Bindungsstellen von p53-Wildtyp zu identifizieren - eine Anzahl, welche anderen ChIPseq-Untersuchungen entspricht (Smeenk et al, 2011). Darüber hinaus konnte durch die Verwendung der hochkooperativen p53-Mutante RR+EE eine etwa ebensogroße Anzahl zusätzlicher niedrigaffiner Bindungsstellen identifiziert werden, die durch Wildtyp-p53 nicht signifikant gebunden wurden. Somit ergab sich eine Gesamtanzahl von knapp 5000 p53-Bindungsstellen, die jeweils nach Kooperativität der bindenden p53-Varianten klassifiziert wurden.

p53 als sequenzspezifischer Transkriptionsfaktor beeinflusst das Zellschicksal im Fall von Stressreizen oder Schädigung von Zelle und DNA und kann sowohl zu Zellzyklusarrest, Seneszenz als auch Apoptose der Zelle führen (siehe Kapitel 2.2). Besonderes Augenmerk bei der Analyse der vorliegenden ChIPseq-Daten lag daher auf dem Einfluss der p53-Kooperativität an die p53-Bindung bekannter Gene aus diesen Bereichen.

4.1 Kooperativität, Zielgenentscheidung und Zielgenexpression

Die Kooperativität von p53 spielt bei der Bindung und Expression des Zielgenspektrums eine entscheidende Rolle. Die Bindung von p53 an die DNA ist in der Regel sequenzspezifisch, typisch ist das Vorliegen eines p53-Konsensusmotivs (siehe Kapitel 2.2.1).

Eine Veränderung der sehr konservierten Nukleotide C und G an Position 4 und 7, bzw. 14 und 17 im kanonischen p53-Bindungsmotiv führt üblicherweise zu einem weitgehenden Verlust der p53-Bindungsaktivität, während eine Veränderung der zentralen Nukleotide A und T lediglich zu einer Reduktion derselben führt (Riley and al., 2008). Dies zeigte sich auch in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten ROC-Analysen, mit denen die Anreicherung des kanonischen p53-Motivs sowie unterschiedlicher Motivvarianten der in der ChIPseq identifizierten BS untersucht wurden (siehe Abb. 3.11 sowie Abb. 3.12). Insbesondere das p53-Halbmotiv und das Vollmotiv mit Spacerelementen lagen an niedrigaffinen BS, an denen ausschließlich p53-RR+EE band, im Verhältnis zum kanonischen p53-Motiv häufiger vor als an hochaffinen BS, an denen auch Wildtyp-p53, sowie niedrigkooperatives p53-RR binden konnte. Hochkooperatives p53 ist also eher in der Lage auch an BS mit modulierter p53-Konsensussequenz zu binden.

Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung liegt im Aufbau des Bindungsmotivs von p53. So besitzen die besonders konservierten Basenpaare CATG des p53-Bindungsmotivs eine hohe intrinsische Torsionsflexibilität, welche eine wichtige Voraussetzung für die Protein-DNA Bindung darstellt. Kommt es zu einem Nukleotidaustausch im Bereich der beiden mittleren Nukleotide (also zu CAAG, CTAG oder CTTG), ist der Energieaufwand für die nötige Verformung der DNA deutlich höher (Balagurumoothy et al., 2002; Inga et al., 2002). Ebenso führen Spacerelemente zwischen den beiden Halbmotiven oder das Vorliegen ausschließlich des p53-Halbmotivs zu einer deutlich herabgesetzten Bindungsaffinität an der jeweiligen Bindungsstelle (Riley et al., 2008; Menendez et al., 2007). Beno et al., 2011, erklären dies so, dass der Energieaufwand, der für die Verformung und Bindung dieser von der p53-Konsensussequenz abweichenden BS nötig ist, eher von hochkooperativem p53 geleistet

werden kann. Hingegen bindet niedrigkooperatives p53 eher an Sequenzen, wie die p53-Konsensussequenz, an denen nur eine geringe Verformungsenergie aufgebracht werden muss. Schlereth et al., 2010a, vermuten daher, dass schwach kooperatives p53 eher an hochflexible CATG-Sequenzen bindet, während stark kooperatives p53 in der Lage ist die nötige Energie für die Verformung der vergleichsweise starren nicht-CATG-DNA-Sequenzen aufzubringen. Bei den vorliegenden ROC-Analysen war bei nur geringer Veränderung der p53-Konsensussequenz (etwa zu CTAG, CAAG oder CTTG) allerdings keine Anreicherung von BS stärker kooperativer p53-Varianten zu beobachten, wie zu vermuten gewesen wäre. Es ist dabei einschränkend zu berücksichtigen, dass nur höchstsignifikante BS in sämtliche Analysen einbezogen wurden. Folglich lagen das kanonische p53-Vollmotiv sowie das Halbmotiv an nahezu allen BS sehr stark angereichert vor, wodurch eine Differenzierung zwischen den unterschiedlichen p53-Varianten erschwert wurde. Darüber hinaus konnte bei den ROC-Analysen nur eine eingeschränkte Motivauswahl untersucht werden, so dass weitere Motivvarianten unberücksichtigt blieben.

Welche Konsequenzen für die Zielgenbindung ergeben sich nun aus diesen Beobachtungen, dass hochkooperatives p53 eine höhere „Fehlertoleranz“ gegenüber Veränderungen im kanonischen p53-Bindungsmotiv, insbesondere bei Vorliegen lediglich eines Teilmotivs oder zusätzlicher Spacer, aufweist? Die Vermutung liegt nahe, dass eine hohe Kooperativität der p53-DNA-Bindungsdomäne zu einer Erweiterung der möglichen BS auf niedrigaffine BS und damit einhergehend zu einer Ausweitung des Zielgenspektrums führt. In der Tat konnte in vorliegender ChIPseq nachgewiesen werden, dass zahlreiche Gene aus den Bereichen DNA-Reparatur und Zellzyklusarrest, wie beispielsweise *CDKN1A* oder *GADD45A*, hochaffine BS besitzen, die neben Wildtyp-p53 auch von der schwächer kooperativen Mutante p53-RR gebunden werden. Hingegen setzten zahlreiche proapoptotische Gene, wie beispielsweise *BCL10* oder *PMAIP1* (NOXA) eine höhere Kooperativität der p53-H1-Helix voraus, um eine Bindung von p53 zu ermöglichen (siehe Abb. 3.13 sowie Anhang).

Weiterhin ist auch aus in vitro-Experimenten bekannt, dass p53 eine große Anzahl von Genen des Zellzyklusarrestes sowie einige Apoptosegene mit sehr hoher Affinität bindet, während eine ganze Reihe von p53-Zielgenen der p53-Apoptosesignalwege im Promotorbereich deutlich niedriger affine p53-Bindungsstellen aufweisen (Wein-

berg 2005). Dementsprechend zeigten auch Schlereth et al., 2010, dass eine hohe Kooperativität der p53-H1-Helices für die Apoptoseinduktion nach DNA-Schäden unterschiedlicher Genese essentiell ist (Schlereth et al., 2010a).

Die in dieser Arbeit angewendete Methodik der ChIPseq lässt zwar Aussagen über die Bindung von p53 an die DNA, jedoch keine Rückschlüsse auf die tatsächliche Transaktivierung von Zielgenen zu. Um Aussagen darüber treffen zu können, wurden somit Daten aus Mikroarrayanalysen zu Wildtyp-p53 und den p53-Mutanten RR, EE, sowie RR+EE, in vorliegender Arbeit berücksichtigt. Diese ergaben, dass die Bindung der Zielgene durch p53 nicht in allen Fällen auch zu deren tatsächlichen Aktivierung führte (siehe Abb 3.15). So wurden bei 1042 durch p53-RR+EE gebundene Gene nur 274 Gene auch tatsächlich induziert, während bei 48 durch p53-RR gebundenen Genen 46 Gene aktiviert wurden. Interessanterweise wiesen nicht alle im Mikroarray induzierten Gene auch eine p53-BS in der ChIPseq auf (siehe Tab. 4.5). Dies galt in erster Linie für Wildtyp-p53 (200 induzierte Gene, davon 85 mit Wildtyp-p53-BS), sowie p53-RR (46 induzierte Gene, davon 18 mit p53-RR-BS). Hingegen besaßen alle durch p53-RR+EE induzierte Gene auch eine p53-RR+EE-BS. Eine Erklärung für diese Beobachtung wäre, dass Wildtyp- und RR-p53 die BS dieser Gene verhältnismäßig schwach bindet, so dass diese BS unter den von uns gesetzten Threshold fallen. Diese Annahme würde eine Bindung des höher kooperativen p53-RR+EE an diesen Genen stützen. Eine alternative Erklärung wären indirekte Mechanismen, bei denen etwa p53 über einen Kaskadeneffekt die Transaktivierung weiterer Gene induziert.

Weiterhin ging die Erhöhung der Kooperativität im Vergleich mit Wildtyp-p53 in der ChIPseq mit einer deutlichen Ausweitung der Zielgenbindung auf zahlreiche Apoptosegene einher. Hingegen hatte eine Erniedrigung der Kooperativität umgekehrt eine Verkleinerung des Zielgenspektrums zur Folge. Ein anderes Bild zeigte sich in der Mikroarrayanalyse, wo sich die Expressionsmuster von p53-RR+EE und Wildtyp-p53 ähnelten (siehe Abb. 3.15, 3.17 und 3.18). Eine Vielzahl an Apoptosegenen wurde dementsprechend zwar von dem hochkooperativen p53-RR+EE gebunden, allerdings in ihrer Expression nicht signifikant induziert. Die in ihrer Kooperativität beeinträchtigte Mutante p53-RR zeigte hingegen ein deutlich anderes Expressionsverhalten als Wildtyp-p53 und induzierte wesentlich weniger Gene, die in der Regel hochaffine BS aufwiesen (siehe Abb. 3.17 und 3.17). Eine hohe Kooperativität ist also offensichtlich zwar

Voraussetzung für die Bindung an eine Vielzahl von (Apoptose-)Genen, nicht jedoch hinreichende Bedingung für deren tatsächliche Transkription.

Ein Faktor, der die Expression gebundener Zielgene beeinflussen kann, ist die Limitierung der in der Zelle vorhandenen Kofaktoren, die für eine effiziente Transkription nötig sind. Durch die Ausweitung des Zielgenspektrums bei Zunahme der Kooperativität werden p53-Kofaktoren an einer größeren Anzahl von Genen rekrutiert, was die Kofaktormenge je Promotor deutlich reduziert. Diesen Effekt belegten Luciferase-Reporter-Experimente für die stark kooperative p53-Mutante RE (Schlereth et al., 2010a). Dies wäre eine Erklärung, weshalb eine Steigerung der Kooperativität im Vergleich mit Wildtyp-p53 nicht im gleichen Maße mit einer Steigerung der Gentranskription einhergeht. Weiterhin wird angenommen, dass sich einige Transkriptionsfaktoren für das effiziente Transaktivieren eines Genes zyklisch an die DNA binden und ablösen müssen. Durch diesen Vorgang können weitere Ko-Faktoren, die für die Transaktivierung nötig sind, an den Promotorbereich binden (McNally et al., 2000; Karpova et al., 2008). Es wäre dementsprechend denkbar, dass stark kooperatives p53 an hochaffinen BS derartig fest an die DNA bindet, dass der zyklische Ablöseprozess gestört und somit eine effiziente Transaktivierung des Zielgens behindert wird.

Zusätzlich ist vermutlich auch der zelluläre Kontext, in dem p53 an seine Zielgene bindet, für die Transkription von spezifischen Zielgenen, wie etwa Apoptosegenen, von großer Bedeutung. Eine Reihe von solch kontextabhängigen p53-autonomen Mechanismen wurden beschrieben. So wiesen beispielsweise Gomes und Espinosa am Genlokus von *BBC3* (PUMA) eine auffällige Chromatinstruktur mit sowohl transkriptionsaktivierenden als auch reprimierenden Histonmodifikationen nach (Gomes et Espinosa, 2010). Desweiteren existiert eine Vielzahl von unterschiedlichen Promotorelementen, die etwa die Besetzung des Promotors mit der RNA-Polymerase II und dem Präinitiationskomplex beeinflussen. Auf diese Weise kann die Kinetik sowohl der Aktivierung als auch der Inaktivierung der Zielgenexpression variieren (Morachis et al., 2010). Wie sich diese vielfältigen und zumeist sehr genspezifischen Mechanismen im Einzelnen auf die Transkription von p53-Zielgenen auswirken, ist häufig noch unklar.

Für die ChIPseq wurde die Kooperativität von p53 gezielt über das Einfügen von Mutationen im Bereich der H1-Helix der DNA-Bindungsdomäne verändert und unterschiedliche p53-Mutanten sowie Wildtyp-p53 hinsichtlich ihres DNA-Bindungsverhaltens

miteinander verglichen. Im gesunden Organismus sind jedoch sehr fein gesteuerte und kontrollierte Mechanismen für die p53-abhängige Regulation von Apoptose und Zellzyklusarrest notwendig. Die Zielgenbindung von p53 wird dabei, wie in der Einleitung dieser Arbeit vorgestellt, durch eine Vielzahl von Kofaktoren und posttranslationalen Modifikationen beeinflusst. Schlereth et al., 2010b, stellen dementsprechend die Hypothese auf, dass aktivierende Signale, etwa durch posttranslationale Kofaktoren, zu einer Änderung der Kooperativität der p53-DNA-Bindungsdomäne führen. Da die Kooperativität der H1-Helix eines endogenen p53-Tetramers bisher experimentell nur schlecht messbar ist, ist der Einfluss dieser Modifikationen auf die Kooperativität nur schwer experimentell nachzuweisen und es kann daher in vielen Punkten nur spekuliert werden.

4.2 „Doppelt hält besser“ - spezifische und unspezifische DNA-Bindung

Bei der genaueren Betrachtung aller in der ChIPseq angereicherter DNA-Bereiche fielen zwei Gruppen mit unterschiedlichen Eigenschaften auf. So zeigte ein Großteil der untersuchten p53-BS typische Charakteristika der sequenzspezifischen und kooperativitätsabhängigen DNA-Bindung. Die Sequenzanzahlen pro BS und damit die Bindungsstärke, sowie die Gesamtanzahl an BS, nahmen mit zunehmender Kooperativität der H1-Helix zu (siehe Abb. 3.7). Durch Motivanalysen konnte desweiteren das bekannte p53-Konsensusmotiv an nahezu allen untersuchten BS, unabhängig von der Kooperativität der bindenden Mutanten, nachgewiesen werden (siehe Kapitel 4.1.2). Im Gegensatz dazu standen DNA-Bereiche, die für die hochaffine p53-Mutante RR+EE deutlich geringere Sequenzanzahlen aufwiesen (unter 3 normalisierte Sequenzen), allerdings dem Kriterium der strengen FDR von $< 0,00001$ entsprachen (siehe Abb. 3.9). An diesen Peaks band die unkooperative p53-Mutante EE vergleichbar stark mit den übrigen p53-Mutanten. Hingegen unterschied sich der Mittelwert der Sequenzanzahlen/Peak signifikant von den durchschnittlichen Sequenzanzahlen/Peak der Negativkontrolle GFP und Input. Desweiteren ergaben die Motivanalysen dieser Bereiche nur für eine Minderheit der Peaks das Vorliegen der p53-Konsensussequenz

(siehe Kapitel 4.1.1). Es lag also in diesen nur schwach gebundenen DNA-Bereichen ein p53-Bindungsverhalten vor, welche sich deutlich von der „typischen“ DNA-Bindung unterschied.

Tatsächlich ist eine besondere Eigenart des Transkriptionsfaktors p53 das Vorliegen von zwei unterschiedlichen DNA-Bindungsdomänen - die zentrale DNA-Bindungsdomäne bindet motivabhängig doppelsträngige DNA (el-Deiry, 1992), während die C-terminale Oligomerisationsdomäne der sequenzunabhängigen Bindung an die DNA dient.

Wie kommt es, dass p53 den Luxus von gleich zwei, mit unterschiedlichen Mechanismen an die DNA bindenden Domänen, besitzt? Studien lassen die Vermutung zu, dass die unspezifisch gebundene C-terminale Bindungsdomäne zu einer raschen Translokation entlang der DNA fähig ist, während die zentrale sequenzabhängige Bindungsdomäne durch schnelle Konformationsänderung kurzzeitig Kontakt mit der DNA herstellt und so spezifische Bindungsmotive erkennt. So wird sichergestellt, dass p53 trotz hoher Sequenzspezifität rasch die gesamte DNA auf Bindungsstellen „scannen“ und die Transkription seiner Zielgene veranlassen kann (McKinney et al. 2004, Tafvizi et al., 2010).

Die Vermutung liegt daher nahe, dass es sich bei oben beschriebenen kooperativitätsunabhängig und lediglich schwach angereicherten DNA-Bereichen um unspezifische, über den C-Terminus vermittelte, DNA-Bindung handeln könnte. Um dies zu verifizieren wäre interessant zu untersuchen, welchen Effekt eine Mutation des C-Terminus hätte. Wie es weiterhin zu den beobachteten lokalen Anreicherungen von unspezifisch gebundenem p53 kam, ist unklar und muss spekuliert werden. Mögliche Einflussfaktoren sind etwa die unterschiedliche Zugänglichkeit der DNA durch Vorliegen von Eu- oder Heterochromatin, sowie unterschiedliche dreidimensionale DNA-Strukturen. Möglich sind auch das lokale Vorliegen weiterer Kofaktoren, die zu einer Anreicherung und somit zur Ausbildung von ChIPseq-Peaks führen könnten.

4.3 P53 - Hoffnungsträger der Tumorthherapie

Geschätzte 22 Millionen Patienten weltweit tragen Tumore, bei denen etwa in der Hälfte der Fälle das TP53-Gen durch eine inaktivierende Mutation geschädigt oder in der anderen Hälfte p53 andersweitig in seiner Funktion eingeschränkt ist - p53-basierte Krebstherapien sind somit eine der vielversprechendsten Behandlungsmöglichkeiten der modernen Krebsforschung und ein wichtiges Forschungsfeld (Brown et al., 2009). In der Mehrzahl der Fälle handelt es sich um Punktmutationen im Bereich der sequenzspezifischen DNA-Bindungsdomäne, die durch Austausch einer Aminosäure zu einer Minderung oder gar einem völligen Verlust der DNA-Bindung führt. Wie vorliegende ChIPseq-Analyse zeigt, führt eine Minderung der Kooperativität von p53 zu einer deutlichen Einschränkung der Zielgenbindung und -transkription, welche in erster Linie proapoptotische Gene, bei völligem Funktionsverlust jedoch auch die Gene des Zellzyklusarrestes und der DNA-Reparatur betrifft. Dementsprechend ist denkbar, durch Medikamente, welche die Kooperativität und damit die sequenzspezifische DNA-Bindung von p53 wiederherstellen, mehr Patienten eine vielversprechende und gleichzeitig verhältnismäßig nebenwirkungsarme Krebstherapie zukommen lassen zu können.

Eine Reihe von Strategien um die Aktivität von p53 wiederherzustellen und somit zum Absterben von Krebszellen beizutragen werden derzeit erprobt. So ist beispielsweise das Einbringen von Wildtyp-p53 über adenovirale Vektoren in Krebszellen um deren Apoptose auszulösen in China für bestimmte Krebsarten bereits zugelassen (Ries et al., 2002; Vazquez et al., 2008; Ma et al., 2009). Neben der Gentherapie rücken im Rahmen der „targeted therapy“ weitere Therapieoptionen zunehmend in den Vordergrund, die mithilfe sogenannter „small molecules“ auf das in der Zelle vorhandene p53 abzielen. Üblicherweise wird versucht die Funktion von mutiertem p53 wiederherzustellen oder aber vorhandenes Wildtyp-p53 zu aktivieren. Ein möglicher Ansatzpunkt, der bereits in klinischen Studien getestet wird, ist beispielsweise die Hemmung der in Tumorzellen häufig gesteigerten MDM2-vermittelten Degradation durch die Substanzen Nutlin (Vassilev et al., 2004), MI-219 (Shangary et al., 2008) oder RITA (Issaeva et al., 2004). Die Hoffnung besteht, durch die Hemmung von MDM2 wirksame p53-Spiegel in der Krebszelle zu erreichen und somit Apoptose zu begünstigen.

Mehrere neuere Studien haben jedoch ergeben, dass es nicht damit getan ist, lediglich die Aktivität von Wildtyp-p53 wiederherzustellen. So kommen sie am Beispiel epithelialer Tumoren zu widersprüchlichen Ergebnissen, was den Einfluss von im Tumorgewebe vorhandenem Wildtyp-p53 auf Therapieerfolg und Rückfallwahrscheinlichkeit bei klassischer Chemotherapie betrifft. Während Wildtyp-p53, wie zu erwarten, oft einen positiven Effekt auf den langfristigen Erfolg von Chemotherapie hat, ist dessen Aktivierung in anderen Fällen hingegen von Nachteil (Jackson et al. 2012; Bertheau et al., 2008). Jackson et al., 2012, zeigten etwa an doxorubicinbehandelten Brusttumoren von MMTV-*Wnt-1*-Mäusen, dass der Verlust von Wildtyp-p53 in Hinblick auf Tumorrückgang und längere tumorfreie Überlebenszeit vorteilhaft sein kann. Sie erklären den zugrundeliegenden Mechanismus so, dass das Vorliegen von Wildtyp-p53 in diesen Tumoren zu Zellzyklusarrest und Seneszenz führt und die Tumorzellen sich somit der Apoptose entziehen können. Welche Zielgensets jeweils gebunden - und letztendlich in ihrer Expression induziert werden - ist, wie in der vorliegenden Arbeit vorgestellt, essentiell abhängig von der H1-Helix-Kooperativität. Schlereth et al., 2013, wiesen dementsprechend anhand von Mikroarraydaten von Brustkrebspatienten nach, dass nur eine Hochregulation proapoptotischer Zielgene mit einer positiven klinischen Prognose einhergeht, nicht jedoch die Expression von Proarrestgenen. Es ist somit anzunehmen, dass für ein günstiges Behandlungsergebnis die Aktivierung von hochkooperativem p53 - und damit die Bindung an proapoptotische Gene - von entscheidender Bedeutung ist. Hingegen führt die Aktivierung von niedrigkooperativem p53 durch die Induktion von Zellzyklusarrest und Seneszenz eher zu ungünstigen Behandlungsergebnissen. Die Einteilung von p53-Zielgenen in hoch- und niedrigkooperativ ist somit nicht lediglich ein theoretisches Konstrukt, sondern klinisch für die erfolgreiche Krebstherapie von hoher Relevanz.

Neben der Induktion der Apoptose in Tumorzellen ist p53 noch in weiterer Hinsicht für die Krebstherapie relevant. So führt die Aktivierung von p53 durch genotoxische Chemo- und Radiotherapien zur Aktivierung der p53-abhängigen Apoptose auch in gesunden Geweben und somit zu einer Vielzahl unerwünschter und häufig behandlungslimitierender Nebenwirkungen (Botchkarev et al., 2000). Eine kurzzeitige Inaktivierung von p53 in gesunden Zellen könnte daher eine höher dosierte und damit effektivere Therapie bei gleichzeitig geringeren systemischen Nebenwirkungen ermögli-

chen. Denkbar wäre somit über eine gezielte Verminderung der p53-Kooperativität in gesundem Gewebe die therapeutische Unterdrückung von Apoptose bei gleichzeitiger Erhaltung von Zellzyklusarrest und DNA-Reparatur. Ein möglicher Kandidat ist der p53-Inhibitor Pifithrin (PFT), für den eine Milderung der Apoptose in gesunden Zellen und damit der therapeutischen Nebenwirkungen unter Chemotherapiebehandlung in Mausexperimenten bereits nachgewiesen werden konnte (Liu X et al., 2004; Zhang M et al., 2003).

Obengenannte Beispiele verdeutlichen, wie komplex und ambivalent sich p53 als wichtiger Tumorsuppressor unter Chemotherapie verhält, und welche entscheidende Rolle dabei der kooperativitätsabhängigen Zielgenbindung für das Schicksal von Krebszellen - und somit letztendlich des Patienten - zukommt. Die genaue Kenntnis dieser Vorgänge und Mechanismen ist für den möglichen therapeutischen Einsatz von p53 bei Krebserkrankungen daher von essentieller Bedeutung.

Zunehmend wird deutlich, dass p53 neben seiner Eigenschaft als Tumorsuppressor auch eine große Anzahl weiterer Prozesse reguliert und damit nicht nur auf die Tumorentstehung, sondern auf eine ganze Reihe von Pathologien Einfluß nimmt. So gibt es Anhaltspunkte dafür, dass p53 auch Prozesse wie die Modulation von Stammzellen, die Fruchtbarkeit, Alterungsprozesse, Neurodegeneration und Ischämie beeinflussen kann (Vousden et Prives, 2009). Nicht in jedem Falle ist p53-abhängige Apoptose, die auf eine große Bandbreite von Stresssignalen erfolgt, wünschenswert und vorteilhaft, sondern häufig stellt sie sogar einen Teil des pathologischen Geschehens dar. So hat die bei hypoxischen Zuständen - wie im Infarkt- oder Schlaganfallgeschehen - durch p53 ausgelöste Apoptose nachteiligen Effekt auf den Krankheitsverlauf und ein Unterdrücken derselben durch kurzzeitige Inhibition von p53 kann in diesen Fällen zu einer Rettung betroffenen Gewebes führen (Crumrine et al., 1994; Liu et al., 2006).

Eine weitere Gruppe von Pathologien, in deren Kontext die durch p53 ausgelöste Apoptose eine Rolle zu spielen scheint, sind neurodegenerative Erkrankungen. Diese umfassen neurodegenerative Vorgänge bei Chorea Huntington (Bae et al.; Feng et al., 2006), den Verlust dopaminerger Neurone bei Parkinson (Breitaud et al., 2007) sowie den Neuronenverlust bei der Alzheimerschen Krankheit (de la Monte, 1998; Culmsee und Landshamer, 2006; Lanni et al., 2007). Dem gegenüber stehen Ergebnisse, die zeigen, dass p53 bei Prozessen des neuronalen Wachstums und der Axonregeneration

eine begünstigende Rolle zu spielen scheint, sowie bei der Erneuerung neuronaler Stammzellen von Bedeutung ist (Di Giovanni et al., 2006; Meletis et al., 2006).

Auch in einen weiteren physiologischen Prozess wird die kontroverse Rolle, die p53 häufig einnimmt, deutlich: in seiner Bedeutung für Langlebigkeit und Alterung. So zeigten Mausexperimente mit Tieren, die ein durch Mutation überaktives p53 exprimierten zwar wie erwartet eine niedrigere Tumorraten, allerdings ebenfalls frühzeitiger Merkmale der Alterung und eine verringerte Lebenserwartung (Campisi et al., 2002; Donehower et al., 2002). Eine mögliche Erklärung für diesen Beobachtung ist der erhöhte oxidative Stress durch die unregulierte p53-Funktion (Matheu et al., 2008). Auf zellulärer Ebene ist lange bekannt, dass p53 Seneszenz auslösen kann (Gottlieb et Oren 1996) und die Akkumulation solcher seneszenten Zellen ist ein wichtiges Element, welches die Alterung eines Organismus begleitet (Coppe et al., 2008). In anderen Experimenten, in denen durch eine zusätzliche Kopie des p53-Genes oder durch eine reduzierte MDM2-Expression die Menge an p53 in der Zelle erhöht war, konnte dieser „proaging“ Effekt von p53 jedoch nicht nachgewiesen werden (Garcia-Cao et al. 2002; Mendrysa et al. 2003/2006, Matheu et al., 2007). Gegebenenfalls ist dies darin begründet, dass p53 über alternative Signalwege, wie etwa die negative Regulation des IGF/mTOR-Signalwegs, auch der Alterung eines Organismus entgegenwirken kann (Matheu et al., 2007; Feng et al., 2008).

Entsprechend dieser Vielzahl an Prozessen und biologischer Funktionen, auf die p53 Einfluss nimmt, ergaben die in vorliegender Promotion durchgeführten GSEAs für die in der ChIPseq gebundenen Genen eine Anreicherung einer Vielzahl biologischer Prozesse (siehe Tab. 4.4). Neben den, nicht nur für die Tumorsuppression wichtigen, zentralen Funktionen von p53 wie Regulation von Zellzyklus, DNA-Reparatur und Apoptose, waren auch Gene aus den Bereichen des Lipidmetabolismus, neurologischer Systemprozesse, interzellulärer Signale und der anatomischen Strukturmorphogenese angereichert. Aussagen über den Einfluss der H1-Helix-Kooperativität auf diese p53-Funktionen zu treffen, ist aus den in dieser Arbeit vorgestellten Daten jedoch nur sehr eingeschränkt möglich und würde tiefergehende Analysen erfordern. Es wird jedoch offensichtlich, wie essentiell eine genaue Kenntnis der Funktionsweise von p53 für das Verständnis und die Therapie einer Vielzahl von Erkrankungen ist.

4.4 Grenzen und Ausblick dieser Arbeit

Die relativ neue ChIPseq-Methodik ermöglicht - im Gegensatz zu etwa Mikroarrayanalysen, bei denen vordefinierte DNA-Bereiche untersucht werden - eine genomweite Analyse von in vivo-Proteinbindung an die DNA. In vorliegender Arbeit wurden erstmalig ChIPseqs mit p53-H1-Helix-Mutanten durchgeführt, die Rückschlüsse auf den Einfluss der Kooperativität der H1-Helices von p53 auf das DNA-Bindungsverhalten von p53 zulassen. Die Bindung und Expression von Zielgenen und damit der Einfluss von p53 auf das Zellschicksal ist vielfältig und von Zellart und Kontext abhängig. In vorliegender Arbeit wurden SAOS2-Zellen ohne endogenes p53 verwendet, in welche p53-Wildtyp, sowie die H1-Helixmutanten über adenovirale Infektion eingebracht wurden und somit in relativ hohen Konzentrationen exprimiert werden. Allerdings zeigten Schlereth et al., 2010a, dass die p53-Spiegel, die durch standardisierte adenovirale Infektion in Zellen erreicht werden, vergleichbar sind mit solchen nach der Aktivierung von endogenem p53. Dennoch ist bei der Betrachtung vorliegender ChIPseq-Analysen zu berücksichtigen, dass lediglich SAOS2-Zellen untersucht wurden. Es wäre daher wünschenswert, Daten, die aus weiteren Zellarten sowie durch die Aktivierung von endogenem p53 stammen, zum Vergleich heranzuziehen. Um weitere Rückschlüsse auf den Einfluss der H1-Helix-Kooperativität auf die Tumorentstehung in vivo ziehen zu können, wären desweiteren Studien am Mausmodell sinnvoll.

In der vorliegenden Arbeit lag der Schwerpunkt der durchgeführten Analysen auf p53-Zielgenen aus den Bereichen Apoptose, Zellzyklusarrest und DNA-Reparatur. Diese Bereiche stellen jedoch vermutlich lediglich einen Ausschnitt der Prozesse in einer humanen Zelle dar, die p53 modulieren kann. Diese Vorgänge sind überaus komplex, in vielen Aspekte bislang nur unvollständig verstanden und konnten in dieser Arbeit lediglich kurz beleuchtet werden. Es wäre möglich und wünschenswert, mithilfe der ChIPseq-Daten Analysen zu Genen weiterer Vorgänge, etwa im Zusammenhang mit neuronalen und metabolischen Prozessen, durchzuführen.

Zu berücksichtigen ist weiterhin, dass die in dieser Arbeit verwendeten hoch- oder niedrigkooperativen H1-Helixmutanten ein „Modell“ darstellen, bei denen die H1-Helix-Kooperativität über das Einfügen von gezielten Mutationen der H1-Helix erfolgt und damit nicht weiter regulierbar ist. Es ist zu vermuten, dass hingegen die Regulation der

H1-Helixkooperativität von Wildtyp-p53 in Säuger-Zellen durch ein kontextabhängiges „Finetuning“ erfolgt. Dies ist jedoch unzureichend verstanden und in vielen Punkten kann bislang lediglich spekuliert werden. Die Hoffnung besteht, über ein besseres Verständnis dieser Vorgänge und der zugrunde liegenden Mechanismen langfristig einen Beitrag zur erfolgreichen Therapie von Krebserkrankungen leisten zu können.

Kapitel 5

Literaturverzeichnis

AYLON Y, Oren M. Living with p53, dying of p53. *Cell*. 2007; 130:597-600

BAE BI, XU H, IGARASHI S, FUJIMURO M, AGRAWAL N, TAYA Y, HAYWARD SD, MORAN TH, MONTELL C, ROSS CA, SNYDER SH, SAWA A. p53 mediates cellular dysfunction and behavioral abnormalities in Huntington's disease. *Neuron*. 2005 Jul 7;47(1):29-41

BALAGURUMOORTHY P, LINDSAY SM, HARRINGTON RE. Atomic force microscopy reveals kinks in the p53 response element DNA. *Biophys. Chem*. 2002; 101-102, 611-623

BAILEY T, Elkan C. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proceedings of the Second International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*, 1994: 28-36

BARTEK J, BARTKOVA J, VOJTESEK B, STASKOVA Z, LUKAS J, REJTHAR A, KOVARIK J, MIDGLEY CA, GANNON JV, LANE DP. Aberrant expression of the p53 oncoprotein is a common feature of a wide spectrum of human malignancies. *Oncogene*. 1991 Sep;6(9):1699-1703

BENSAAD K, VOUSDEN K.H. Savior and slayer: the two faces of p53. *Nat. Med*. 2005; 11:1278-1279

BELL S, KLEIN C, MÜLLER L, HENSEN S, BUCHNER JJ. p53 contains large unstructured regions in its native state. *Mol Biol*. 2002 Oct 4;322(5):917-927

BENO I, ROSENTHAL K, LEVITINE M, SHAULOV L, HARAN TE. Sequence-dependent cooperative binding of p53 to DNA targets and its relationship to the structural properties of the DNA targets. *Nucleic Acids Res*. 2011 Mar;39(5):1919-1932

BERGER AH, KNUDSON AG, PANDOLFI PP. A continuum model for tumour suppression. *Nature*, 2011 Aug 10;476(7359):163-169

BERTHEAU P, ESPIE M, TURPIN E, LEHMANN J, PLASSA LF, VARNA M, JANIN A, DE THE H. TP53 status and response to chemotherapy in breast cancer. *Pathobiology*. 2008;75(2):132-139

BOND GL, HU W, BOND EE, ROBINS H, LUTZKER SG, ARVA NC, BARGONETTI J, BARTEL F, TAUBER H, WUERL P, ONEL K, YIP L, HWANG SJ, STRONG LC, LOZANO G, LEVINE AJ. A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. *Cell*. 2004 Nov 24;119(5):591-602

BOS JL. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res*. 1989 Sep 1;49(17):4682-4689

BOTCHKAREV VA, KOMAROVA EA, SIEBENHAAR F, BOTCHKAREVA NV, KOMAROV PG, MAURER M, GILCHREST BA, GUDKOV AV. p53 is essential for chemotherapy-induced hair loss. *Cancer Res*. 2000 Sep 15;60(18):5002-5006

BRETAUD S, ALLEN C, INGHAM PW, BANDMANN O. p53-dependent neuronal cell death in a DJ-1-deficient zebrafish model of Parkinson's disease. *J Neurochem*. 2007 Mar;100(6):1626-1635

BROSH R, ROTTER V. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat Rev Cancer*. 2009 Oct;9(10):701-713

BROWN CJ, LAIN S, VERMA CS, FERSHT AR, LANE DP. Awakening guardian angels: drugging the p53 pathway. *Nat Rev Cancer*. 2009 Dec;9(12):862-873

BUCHDUNGER E, ZIMMERMANN J, METT H, MEYER T, MÜLLER M, DRUKER BJ, LYDON NB. Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res*. 1996 Jan 1;56(1):100-104

BUDANOV AV, KARIN M. p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling. *Cell*. 2008; 134:451-460

BUSH JA, LI G. Cancer chemoresistance: the relationship between p53 and multidrug transporters. *Int. J. Cancer*. 2002; 98,323-330

BUTLER JS, LOH SN. Kinetic partitioning during folding of the p53 DNA binding domain. *Mol Biol*. 2005 Jul 29;350(5):906-918

CAIN C, MILLER S, AHN J, PRIVES C. The N terminus of p53 regulates its dissociation from DNA. *J Biol Chem*. 2000 Dec 22;275(51):39944-39953

CAMPISI J. Cancer and aging: yin, yang, and p53. *Sci Aging Knowledge Envi-*

ron. 2002 Jan 9;2002(1):pe1. Review.

CANADILLAS JM, TIDOW H, FREUND SM, RUTHERFORD TJ, ANG HC, FERSHT AR. Solution structure of p53 core domain: structural basis for its instability. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Feb 14;103(7):2109-2101

CHAN WM, SIU WY, LAU A, POON RY. How many mutant p53 molecules are needed to inactivate a tetramer? *Mol Cell Biol* 2004;24: 3536-3551

CHEN Y, DEY R, CHEN L. Crystal structure of the p53 core domain bound to a full consensus site as a self-assembled tetramer. *Structure*. 2010 Feb 10;18(2):246-256

CHIN KV, UEDA K, PASTAN I, GOTTESMAN MM. Modulation of activity of the promoter of the human MDR1 gene by Ras and p53. *Science*. 1992 Jan 24;255(5043):459-462

CHO Y, GORINA S, JEFFREY PD, PAYLETICH NP. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* 1994; 265:346-355

COPPE JP, PATIL CK, RODIER F, SUN Y, MUNOZ DP, GOLDSTEIN J, NELSON PS, DESPREZ PY, CAMPISI J. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol*. 2008 Dec 2;6(12):2853-2868

COTTER TG. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nat Rev Cancer*. 2009 Jul;9(7):501-507

CRUMRINE RC, THOMAS AL, MORGAN PF. Attenuation of p53 expression protects against focal ischemic damage in transgenic mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1994 Nov;14(6):887-891

DEHNER A, KLEIN C, HANSEN S, MULLER L, BUCHNER J, SCHWAIGER M, et al. Cooperative binding of p53 to DNA: regulation by protein-protein interactions through a double salt bridge. *Angew Chem Int Ed Engl* 2005; 44:5247-5251

DE LA MONTE SM, SOHN YK, GANJU N, WANDS JR. P53- and CD95-associated apoptosis in neurodegenerative diseases. *Lab Invest*. 1998 Apr;78(4):401-411

DENG Y, CHAN SS, CHANG S. Telomere dysfunction and tumour suppression: the senescence connection. *Nat Rev Cancer*. 2008 Jun;8(6):450-458

DI GIOVANNI S, KNIGHTS CD, RAO M, YAKOVLEV A, BEERS J, CATANIA J, AVANTAGGIATI ML, FADEN AI. The tumor suppressor protein p53 is requi-

red for neurite outgrowth and axon regeneration. *EMBO J.* 2006 Sep 6;25(17):4084-4096

DONEHOWER LA. Does p53 affect organismal aging? *J Cell Physiol.* 2002 Jul;192(1):23-33

DUNKER AK, CORTESE MS, ROMERO P, IAKOUCHEVA LM, UVERSKY VN. Flexible nets. The roles of intrinsic disorder in protein interaction networks. *FEBS J.* 2005 Oct;272(20):5129-5148

EL-DEIRY WS, KERN SE, PIETENPOL JA, KINZLER KW, VOGELSTEIN B. Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet.* 1992 Apr;1(1):45-49

EL-DEIRY WS. Regulation of p53 downstream genes. *Semin Cancer Biol.* 1998;8(5):345-357

ELIYAHU D, RAZ A, GRUSS P, GIVOL D, OREN M. Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells. *Nature.* 1984;312:646-649

ELIYAHU D, GOLDFINGER N, PINHASI-KIMHI O, SHAULSKY G, SKURNIK Y, ARAI N, ROTTER V, OREN M. Meth A fibrosarcoma cells express two transforming mutant p53 species. *Oncogene.* 1988;3:313-321

ELIYAHU D, MICHALOVITZ D, ELIYAHU S, PINHASI-KIMHI O, OREN M. Wild-type p53 can inhibit oncogene-mediated focus formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86:8763-8767

ESPINOSA JM, EMERSON BM. Transcriptional regulation by p53 through intrinsic DNA/chromatin binding and site-directed cofactor recruitment. *Mol Cell.* 2001 Jul;8(1):57-69

FENG Z, JIN S, ZUPNICK A, HOH J, DE STANCHINA E, LOWE S, PRIVES C, LEVINE AJ. p53 tumor suppressor protein regulates the levels of huntingtin gene expression. *Oncogene.* 2006 Jan 5;25(1):1-7

FINLAY CA, HINDS PW, TAN TH, ELIYAHU D, OREN M, LEVINE AJ. Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life. *Mol Cell Biol.* 1988;8:531-539

FINLAY CA, HINDS PW, LEVINE AJ. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell.* 1989;57:1083-1093

FRIEDLER A, VEPRINTSEY DB, HANSSON LO, FERSHT AR. Kinetic instability of p53 core domain mutants: implications for rescue by small molecules. *J Biol Chem.* 2003 Jun 27;278(26):24108-12

FRIEDLER A, VEPRINTSEV DB, FREUND SM, VON GLOS KI, FERSHT AR. Modulation of binding of DNA to the C-terminal domain of p53 by acetylation. *Structure*. 2005 Apr;13(4):629-36.

FUNK WD, PAK DT, KARAS RH, WRIGHT WE, SHAY JWA. Transcriptionally active DNA-binding site for human p53 protein complexes. *Mol Cell Biol*. 1992 Jun;12(6):2866-71.

GARCIA-CAOI I, GARCIA-CAO M, MARTIN-CABALLERO J, CRIADO LM, KLATT P, FLORES JM, WEILL JC, BLASCO MA, SERRANO M. Super p53 mice exhibit enhanced DNA damage response, are tumor resistant and age normally. *EMBO J*. 2002 Nov 15;21(22):6225-6235

GATZ SA, WIESMÜLLER L. p53 in recombination and repair. *Cell Death Differ*. 2006 Jun;13(6):1003-16.

GOMES NP, ESPINOSA JM. Disparate chromatin landscapes and kinetics of inactivation impact differential regulation of p53 target genes. *Cell Cycle*. 2010 Sep 1;9(17):3428-3437

GONZALEZ KD, NOLTNER KA, BUZIN CH, GU D, WEN-FONG CY, NGUYEN VQ, HAN JH, LOWSTUTER K, LONGMATE J, SOMMER SS, WEITZEL JN. Beyond Li Fraumeni Syndrome: clinical characteristics of families with p53 germline mutations. *J Clin Oncol*. 2009 Mar 10;27(8):1250-1256

GOTTLIEB TM, OREN M. p53 in growth control and neoplasia. *Biochim Biophys Acta*. 1996 Jun 7;1287(2-3):77-102

GRANDER D. How do mutated oncogenes and tumor suppressor genes cause cancer? *Med Oncol*. 1998 Apr;15(1):20-6

GUPTA S, STAMATOYANNOPOULOS JA, Bailey T, NOBLE S. Quantifying similarity between motifs. *Genome Biology*, 8(2):R24, 2007

HALAZONETIS TD, GORGOULIS VG, BARTEK J. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science*. 2008 Mar 7;319(5868):1352-1355

HANAHAN D, WEINBERG RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57-70

HARRIS CR, DEWAN A, ZUPNICK A, NORMART R, GABRIEL A, PRIVES C, LEVINE AJ, HOH J. p53 responsive elements in human retrotransposons. *Oncogene* 2009;28:3857-3386

HAUPT Y, MAYA R, KAZAS A, OREN M. Mdm2 promotes the rapid degrada-

tion of p53. *Nature*. 1997;387:296-9

HO WC, FITZGERALD MX, MARMORSTEIN R. Structure of the p53 core domain dimer bound to DNA. *J Biol Chem*. 2006 Jul 21;281(29):20494-20502

HOLLSTEIN M, SIDRANSKY D, VOGELSTEIN B, HARRIS CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991; 253, 49-53

HONDA R, TANAKA H, YASUDA H. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett*. 1997; 420:25-27

INGA A, STORICI F, DARDEN TA, RESNICK MA. Differential transactivation by the p53 transcription factor is highly dependent on p53 level and promoter target sequence. *Mol. Cell. Biol*. 22, 2002; 8612-8625

ISSAEVA N, BOZKO P, ENGE M, PROTOPOPOVA M, VERHOEF LG, MASSUCCI M, PRAMANIK A, SELIVANOVA G. Small molecule RITA binds to p53, blocks p53-HDM-2 interaction and activates p53 function in tumors. *Nat Med*. 2004 Dec;10(12):1321-1328

JACKSON JG, PANT V, LI Q, CHANG LL, QUINTAS-CARDAMA A, GARZA D, TAVANA O, YANG P, MANSHOURI T, LI Y, EL-NAGGAR AK, LOZANO G. p53-mediated senescence impairs the apoptotic response to chemotherapy and clinical outcome in breast cancer. *Cancer Cell*. 2012 Jun 12;21(6):793-806

JÄNICKE RU, SOHN D, SCHULZE-OSTHOFF K. The dark side of a tumor suppressor: anti-apoptotic p53. *Cell Death Differ*. 2008 Jun;15(6):959-976

JENKINS JR, RUDGE K, CURRIE GA. Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation-associated phosphoprotein p53. *Nature*. 1984;312:651-654

JOERGER AC, FERSHT AR. *Oncogene*. Structure-function-rescue: the diverse nature of common p53 cancer mutants. 2007 Apr 2;26(15):2226-6242.

KAMIJO T, WEBER JD, ZAMBETTI G, ZINDY F, ROUSSEL MF, SHERR CJ. Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jul 7;95(14):8292-8297

KARPOVA TS, KIM MJ, SPRIET C, NALLEY K, STASWVICH TJ, KHERROUCHE Z, HELIOT L, MCNALLY JG. Concurrent fast and slow cycling of a transcriptional activator at an endogenous promoter. *Science*. 2008 Jan 25;319(5862):466-9. doi: 10.1126/science.1150559.

KERN SE, KINZLER KW, BRUSKIN A, JAROSZ D, FRIEDMAN P, PRIVES C, VOGELSTEIN B. Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein.

Science 1991; 252:1708-1711

KITAYNER M, ROZENBERG H, KESSLER N, RABINOVICH D, SHAULOV L, HARAN TE, SHAKKED Z. Structural basis of DNA recognition by p53 tetramers. *MMol Cell*. 2006 Jun 23;22(6):741-753

KLEIN C, GEORGES G, KÜNKELE KP, HUBER R, ENGH RA, HANSEN S. High thermostability and lack of cooperative DNA binding distinguish the p63 core domain from the homologous tumor suppressor p53. *J Biol Chem*. 2001 Oct 5;276(40):37390-37401

LALLOO F, VARLEY J, MORAN A, ELLIS D, O'DAIR L, PHAROAH P, ANTONIOU A, HARTLEY R, SHENTON A, SEAL S, BULMAN B, HOWELL A, EVANS DG. BRCA1, BRCA2 and TP53 mutations in very early-onset breast cancer with associated risks to relatives. *Eur J Cancer*. 2006 May;42(8):1143-1150

LANE DP. Cancer. P53, guardian of the genome. *Nature*. 1992; 358(6381):15-6

LANNI C, UBERTI D, RACCHI M, GOVONI S, MEMO M. Unfolded p53: a potential biomarker for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2007 Aug;12(1):93-99

LEVINE AJ, OREN M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer*. 2009 Oct;9(10):749-758

LI FP, FRAUMENI JFJ, MILVIHILL JJ, BLATTNER WA, DREYFUS MG, TUVKER MA, MILLER RW. A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. *Cancer Res*. 1988; 48:5358-5362

LI R, SUTPHIN PD, SCHWARTZ D, MATAS D, ALMOG N, WOLKOWICZ R, GOLDFINGER N, PEI H, PROKOCIMER M, ROTTER V. Mutant p53 protein expression interferes with p53-independent apoptotic pathways. *Oncogene*. 1998 Jun 25;16(25):3269-3277.

LINZER DI, MALTZMAN W, LEVINE AJ. The SV40 A gene product is required for the production of a 54,000 MW cellular tumor antigen. *Virology*. 1979 Oct 30;98(2):308-301

LIU G, PARANT JM, LANG G, CHAU P, CHAVEZ-REYES A, EL-NAGGAR AK, MULTANI A, CHANG S, LOZANO G. Chromosome stability, in the absence of apoptosis, is critical for suppression of tumorigenesis in Trp53 mutant mice. *Nat Genet*. 2004 Jan;36(1):63-68

LIU X, CHUA CC, GAO J, CHEN Z, LANDY CL, HAMDY R, CHUA BH. Pifithrin-alpha protects against doxorubicin-induced apoptosis and acute cardiotoxicity in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004 Mar;286(3):H933-939

LIU P, XU B, CAVALIERI TA, HOCK CE. Pifithrin- α attenuates p53-mediated apoptosis and improves cardiac function in response to myocardial ischemia/reperfusion in aged rats. *Shock*. 2006 Dec;26(6):608-614

MA B, PAN Y, ZHENG J, LEVINE AJ, Nussinov R. Sequence analysis of p53 response-elements suggests multiple binding modes of the p53 tetramer to DNA targets. *Nucleic Acids Res*. 2007;35:2986-3001

MA G, SHIMADA H, HIROSHIMA K, TADA Y, SUZUKI N, TAGAWA M. Gene medicine for cancer treatment: commercially available medicine and accumulated clinical data in China. *Drug Des Devel Ther*. 2009 Feb 6;2:115-122

MALECKA KA, HO WC, MARMORSTEIN R. Crystal structure of a p53 core tetramer bound to DNA. *Oncogene*. 2009 Jan 22;28(3):325-333

MALKIN D, LI FP, STRONG LC, FRAUMENI JF Jr, NELSON CE, KIM DH, KASSEL J, GRYKA MA, BISCHOFF FZ, TAINSKY MA et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science*. 1990 Nov 30;250(4985):1233-1238

MARINE JC, FRANCOZ S, MAETENS M, WAHL G, TOLEDO F, LOZANO G. (2006). Keeping p53 in check: essential and synergistic functions of Mdm2 and Mdm4. *Cell Death Differ*. 2006;13: 927-934

MATHEU A, MARAVER A, SERRANO M. The Arf/p53 pathway in cancer and aging. *Cancer Res*. 2008 Aug 1;68(15):6031-6034 MCKINNEY K, PRIVES C. Efficient specific DNA binding by p53 requires both its central and C-terminal domains as revealed by studies with high-mobility group 1 protein. *Mol Cell Biol*. 2002 Oct;22(19):6797-808

MATHEU A, MARAVER A, KLATT P, FLORES I, GARCIA-CAO I, BORRAS C, FLORES JM, VINA J, BLASCO MA, SERRANO M. Delayed ageing through damage protection by the Arf/p53 pathway. *Nature*. 2007 Jul 19;448(7151):375-379

MCKINNEY K, MATTIA M, GOTTIFREDI V, PRIVES C. p53 linear diffusion along DNA requires its C terminus. *Mol Cell*. 2004 Nov 5;16(3):413-424

MCLAUGHLIN P, GRILLO-LOPEZ AJ, LINK BK, LEVY R, CZUCZMAN MS, WILLIAMS ME, HEYMAN MR, BENCE-BRUCKLER I, WHITE CA, CABANILIAS F, JAIN V, HO AD, LISTER J, WEY K, SHEN D, DALLAIRE BK. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol*. Nr. 16(8), 1998;2825-2833

MCNALLY JG, MÜLLER WG, WALKER D, WOLFORD R, HAGER GL. The

glucocorticoid receptor: rapid exchange with regulatory sites in living cells. *Science*. 2000 Feb 18;287(5456):1262-5.

MELETIS K, WIRTA V, HEDE SM, NISTER M, LUNDEBERG J, FRISEN J. p53 suppresses the self-renewal of adult neural stem cells. *Development*. 2006 Jan;133(2):363-369

MIYASHITA T, KRAJEVSKI S, KRAJEVSKA M, WANG HG, LIN HK, LIEBERMANN DA, HOFFMAN B, REED JC. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene*, 1994 Jun;9(6):1799-805

MIYASHITA T and REED JC, Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene, *Cell*, 1995 Jan 27;80(2):293-9

MENENDEZ D, INGA A, JORDAN JJ, RESNICK MA. Changing the p53 master regulatory network: ELEMENTary, my dear Mr Watson. *Oncogene*. 2007 Apr 2;26(15):2191-21201

MENDRYSA SM, MCELWEE MK, MICHALOWSKI J, O'LEARY KA, YOUNG KM, PERRY ME. mdm2 Is critical for inhibition of p53 during lymphopoiesis and the response to ionizing irradiation. *Mol Cell Biol*. 2003 Jan;23(2):462-472

MICHALAK EM, VILLUNGER A, ADAMS JM, STRASSER A. In several cell types tumour suppressor p53 induces apoptosis largely via Puma but Noxa can contribute. *Cell Death Differ*. 2008 Jun;15(6):1019-29. Epub 2008 Feb 8.

MILNER J, MEDCALF EA. Cotranslation of activated mutant p53 with wild type drives the wild-type p53 protein into the mutant conformation. *Cell* 1991; 65, 765-774

MOMAND J, ZAMBETTI GP, OLSON DC, GEORGE D, LEVINE AJ. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell*. 1992;69:1237-1245

MORACHIS JM, MURAWSKY CM, EMERSON BM. Regulation of the p53 transcriptional response by structurally diverse core promoters. *Genes Dev*. 2010 Jan 15;24(2):135-147

MÜLLER M, STRAND S, HUG H, HEINEMANN EM, WALCZAK H, HOFMANN WJ, STREMMEL W, KRAMMER PH, GALLE PR. Drug-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system and involves activation of wild-type p53. *J Clin Invest*. 1997 Feb 1;99(3):403-13.

MÜLLER M, WILDER S, BANNASCH D, ISRAELI D, LEHLBACH K, LI-WEBER M, FRIEDMAN SL, GALLE PR, STREMMEL W, OREN M, KRAMMER PH. p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer

drugs. J Exp Med. 1998 Dec 7;188(11):2033-45

MÜLLER-TIEMANN BF, HALAZONETIS TD, ELTING JJ. Identification of an additional negative regulatory region for p53 sequence-specific DNA binding. Proc Natl Acad Sci U S A.; 1998 May 26;95(11):6079-84.

NAKANO K, VOUSDEN KH. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. Mol Cell. 2001 Mar;7(3):683-94.

NICHOLLS CD, MCLURE KG, SHIELDS MA, LEE PW. Biogenesis of p53 involves cotranslational dimerization of monomers and posttranslational dimerization of dimers. Implications on the dominant negative effect. J Biol Chem 2002; 277:12937-12945

ODA E, OHKI R, MURASAWA H, NEMOTO J, SHIBUE T, YAMASHITA T, TOKINO T, TANIGUCHI T, TANAKA N. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. Science. 2000 May 12;288(5468):1053-1058

OLINER JD, PIETENPOL JA, THIAGALINGAM S, GYURIS J, KINZLER KW, VOGELSTEIN B. Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. Nature. 1993 Apr 29;362(6423):857-860

OLIVIER M, HOLLSTEIN M, HAINAUT P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2010 Jan;2(1):a001008

PARADA LF, LAND H, WEINBERG RA, WOLF D, ROTTER V. Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and ras in cellular transformation. Nature 1984;312:649-651

PETITJEAN A, MATHE E, KATO S, ISHIOKA C, TAVTIGIAN SV, HAINAUT P, OLIVIER M. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. Hum. Mutat. 2007; 28, 622-629

PICKSLEY SM, LANE DP. The p53-mdm2 autoregulatory feedback loop: a paradigm for the regulation of growth control by p53? Bioessays. 1993;15:689-690

QIAN H, WANG T, NAUMOVSKI L, LOPEZ CD, BRACHMANN RK. Groups of p53 target genes involved in specific p53 downstream effects cluster into different classes of DNA binding sites. Oncogene 2002;21:7901-7791

RIES S, KORN WM. ONYX-015: mechanisms of action and clinical potential of a replication-selective adenovirus. Br J Cancer. 2002 Jan 7;86(1):5-11

RILEY T, SONTAG E, CHEN P, LEVINE A. Transcriptional control of human

p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 May;9(5):402-412

RIPPIN TM, FREUND SM, VEPRINTSEV DB, FERSHT AR. Recognition of DNA by p53 core domain and location of intermolecular contacts of cooperative binding. *J Mol Biol.* 2002 May 31;319(2):351-358

RIVES C, MANLEY JL. Why is p53 acetylated? *Cell.* 2001; Dec 28;107(7):815-818

ROTTER V. p53, a transformation-related cellular-encoded protein, can be used as a biochemical marker for the detection of primary mouse tumor cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1983; 80,2613-2617

ROWAN S, LUDWIG RL, HAUPT Y, BATES S, LU X, OREN M, VOUSDEN KH. Specific loss of apoptotic but not cell-cycle arrest function in a human tumor derived p53 mutant. *EMBO J.* 1996 Feb 15;15(4):827-838

SAMUELS-LEV Y, OCONNOR DJ, BERGAMASCHI D, TRIGIANTE G, HSIEH JK, ZHONG S, et al. ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53. *Mol Cell.* 2001;8:781-794

Schlereth 2010a: SCHLERETH K, BEINORAVICIUTE-KELLNER, ZEITLINGER MK, BRETZ AC, SAUER M, CHARLES JP, VOGIATZI F, LEICH E, SAMANS B, EILERS M, KISKER C, ROSENWALD A, STIEWE T. DNA binding cooperativity of p53 modulates the decision between cell-cycle arrest and apoptosis. *Mol Cell.* 2010 May 14;38(3):356-368

Schlereth 2010b: SCHLERETH K, CHARLES JP, BRETZ AC, STIEWE T. Life or death: p53-induced apoptosis requires DNA binding cooperativity. *Cell Cycle.* 2010 Oct 15;9(20):4068-4076

SCHLERETH K, HEYL C, KRAMPITZ AM, MERNBERGER M, FINGERNA-GEWL F, SCHARFE M, JAREK M, LEICH E, ROSENWALD A, STIEWE T. Characterization of the p53 cistrome - DNA binding cooperativity dissects p53's tumor suppressor functions. *PLoS Genet.* 2013 Aug;9(8)

SERRANO M, LIN AW, MCCURRACH ME, BEACH D, LOWE SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell.* 1997 Mar 7;88(5):593-602

SHANGARY S, QIN D, MCEACHERN D, LIU M, MILLER RS, QIU S, NIKOLOVSKA-COLESKA Z, DING K, WANG G, CHEN J, BERNARD D, ZHANG J, LU Y, GU Q, SHAH RB, PIENTA KJ, LING X, KANG S, GUO M, SUN Y, YANG D, WANG S. Temporal activation of p53 by a specific MDM2 inhibitor is selectively toxic to tumors and leads to complete tumor growth inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Mar

11;105(10):3933-3938

SMEENK L, VAN HEERINGEN SJ, KOEPEL M, VAN DRIEL MA, BARTELS SJ, AKKERS RC, DENISSOV S, STUNNENBERG HG, LOHRUM M. Characterization of genome-wide p53-binding sites upon stress response. *Nucleic Acids Res.* 2008 Jun;36(11):3639-3654

SMEENK L, VAN HEERINGEN SJ, KOEPEL M, GILBERT B, JANSSEN-MEGENS E, STUNNENBERG HG, LOHRUM M. Role of p53 serine 46 in p53 target gene regulation. *PLoS One.* 2011 Mar 4;6(3):e17574

STEELMAN LS, McCUBREY JA. Intriguing novel abilities of Nutlin-3A: induction of cellular quiescence as opposed to cellular senescence-implications for chemotherapy. *Cell Cycle.* 2009;8:3634-3635

TAFVIZI A, HUANG F, FERSHT AR, MIRNY LA, VAN OIJEN AM. A single-molecule characterization of p53 search on DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Jan 11;108(2):563-568

TIDOW H, MELERO R, MYLONAS E, FREUND SM, GROSSMANN JG, CARAZO JM, et al. Quaternary structures of tumor suppressor p53 and a specific p53 DNA complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104:12324-9.

TOKINO T, THIAGALINGAM S, EL-DEIRY WS, WALDMAN T, KINZLER KW, VOGELSTEIN B. p53 tagged sites from human genomic DNA. *Hum. Mol. Genet.* 1994;3:1537-1542

TOLEDO F, WAHL GM. Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat Rev Cancer.* 2006 Dec;6(12):909-23.

TYNER S, VENKATACHALAM D, CHOI J, JONES S, GHEBRANIOUS N, INGELMAN H, LU X, SORON G, COOPER G, BRAYTON G, PARK SH, THOMPSON T, KARASENTY G, BRADLEY A, DONEHOWER L. p53 mutant mice that display early aging-associated phenotypes. *Nature*, 2001; 415, 45-53

VASSILEV LT, VU BT, GRAVES B, CARVAJAL D, PODLASKI F, FILIPOVIC Z, KONG N, KAMMLOTT U, LUKACS C, KLEIN C, FOTOUHI N, LIU EA. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science.* 2004 Feb 6;303(5659):844-848

VAZQUEZ A, BOND EE, LEVINE AJ, BOND GL. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2008 Dec;7(12):979-987

VOGELSTEIN B, LANE DP, LEVINE AJ. Surfing the p53 network. *Nature.* 2000 Nov 16;408(6810):307-10.

- VOUSDEN KH, LU X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer*. 2002 Aug;2(8):594-604
- VOUSDEN KH, LANE DP. p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Apr;8(4): 275-83.
- VOUSDEN KH, PRIVES C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell*. 2009 May 1;137(3):413-31
- WALKER KK, LEVINE AJ. Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; Dec 24;93(26):15335-15340
- WEI X, XU H, KUFU D. Human MUC1 oncoprotein regulates p53-responsive gene transcription in the genotoxic stress response. *Cancer Cell* 2005; 7, 167-117
- WEI CL, WU Q, VEGA VB, CHIU KP, Ng P, ZHANG T, SHAHAB A, YONG HC, FU Y, WENG Z, LIU J, ZHAO XD, CHEW JL, LEE YL, KUZNETSOV VA, SUNG WK, MILLER LD, LIM B, LIU ET, YU Q, NG HH, RUAN Y. A global map of p53 transcription-factor binding sites in the human genome. *Cell*. 2006 Jan 13;124(1):207-19
- Weinberg 2004a: WEINBERG RL, FREUND SM, VEPRINTSEV DB, BYCROFT M, FERSHT AR. Regulation of DNA binding of p53 by its C-terminal domain. *J Mol Biol*. 2004 Sep 17;342(3):801-811
- Weinberg 2004b: WEINBERG RL, VEPRINTSEV DB, FERSHT AR. Cooperative binding of tetrameric p53 to DNA. *J Mol Biol*. 2004 Aug 27;341(5):1145-1159
- WEINBERG RL, VEPRINTSEV DB, BYCROFT M, FERSHT AR. Comparative binding of p53 to its promoter and DNA recognition elements. *J Mol Biol*. 2005 May 6;348(3):589-596
- WHIBLEY C, PHAROAH PD, HOLLSTEIN M. p53 polymorphisms: cancer implications. *Nat Rev Cancer*. 2009;9:95-107
- WOLF D, HARRIS N, ROTTER V. Reconstitution of p53 expression in a non-producer Ab-MuLV-transformed cell line by transfection of a functional p53 gene. *Cell*. 1984 Aug;38(1):119-126
- YIP KW, REED JC. Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene*. 2008 Oct 27;27(50):6398-6406
- YU J, ZHANG L, HWANG PM, KINZLER KW, VOGELSTEIN B. PUMA induces

the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell*. 2001 Mar;7(3):673-682

ZHANG M, LIU W, DING D, SALVI R. Pifithrin-alpha suppresses p53 and protects cochlear and vestibular hair cells from cisplatin-induced apoptosis. *Neuroscience*. 2003;120(1):191-205

Kapitel 6

Anhang

6.1 Ergänzende Daten

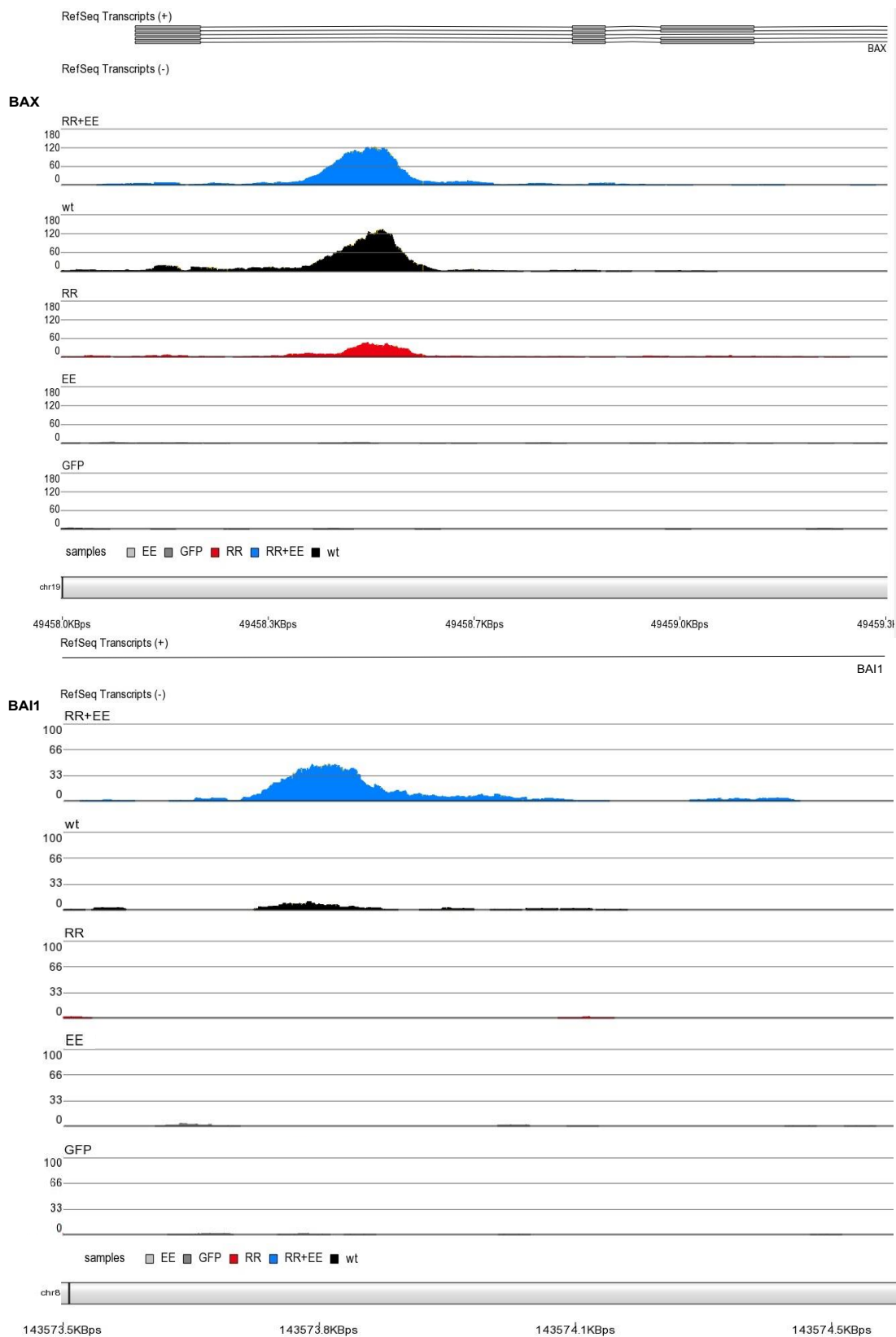


Fig. 6.1: BS Apoptosegene BAX und BAI1 im Partek Genome Browser. Peaks von Wildtyp-p53 (schwarz), sowie der p53-Mutanten RR+EE (blau), RR (rot), EE (grau) und der Negativkontrolle GFP (dunkelgrau). Aufgetragen sind die Anzahl der jeweils angereicherten Sequenzen (Maximum 180 für BAX, sowie 100 für BAI1).

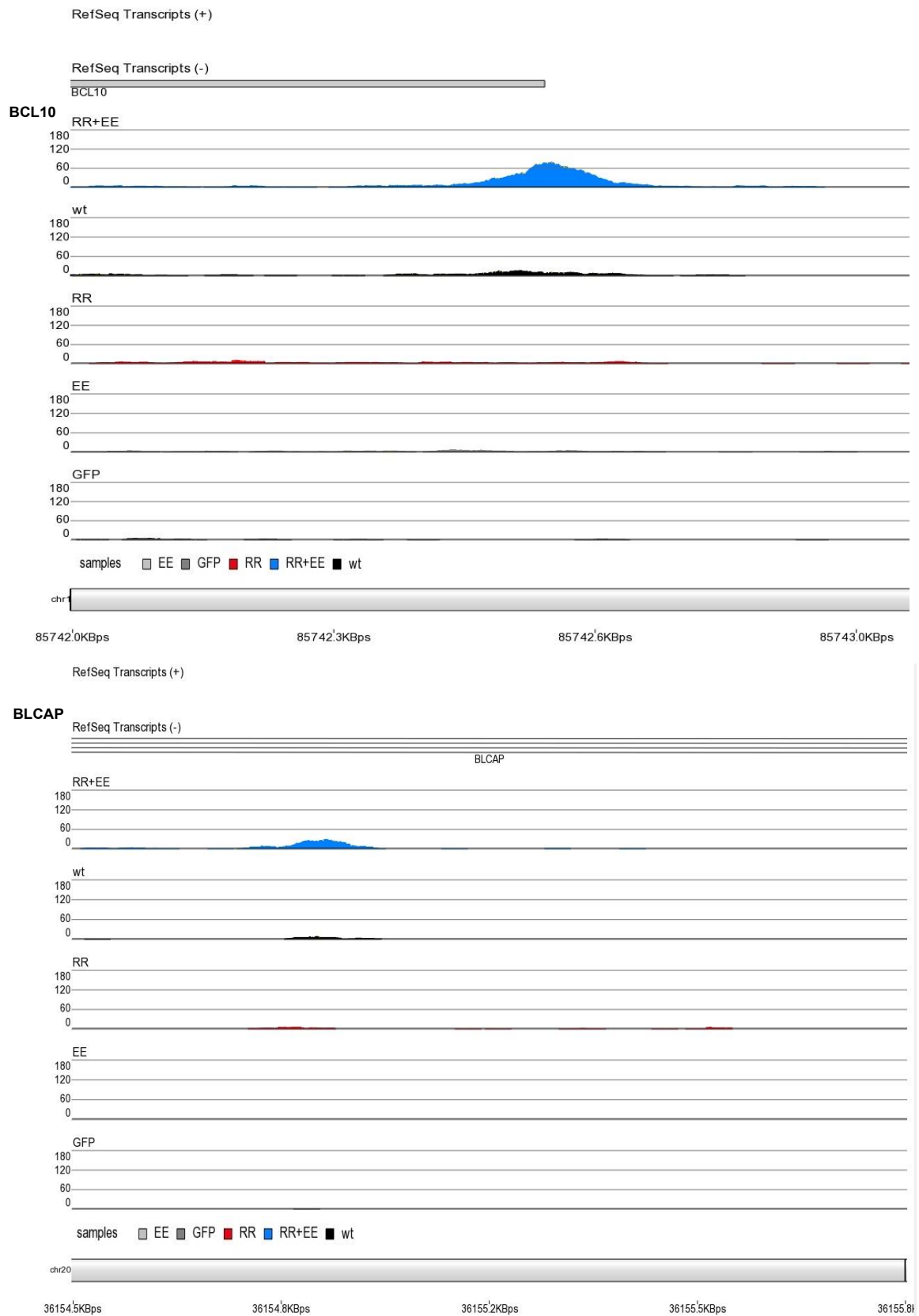


Fig. 6.2: BS der Apoptosegene BCL10 und BLCAP im Partek Genome Browser. Peaks von Wildtyp-p53 (schwarz), sowie der p53-Mutanten RR+EE (blau), RR (rot), EE (grau) und der Negativkontrolle GFP (dunkelgrau). Aufgetragen sind die Anzahl der jeweils angereicherten Sequenzen (Maximum 180).

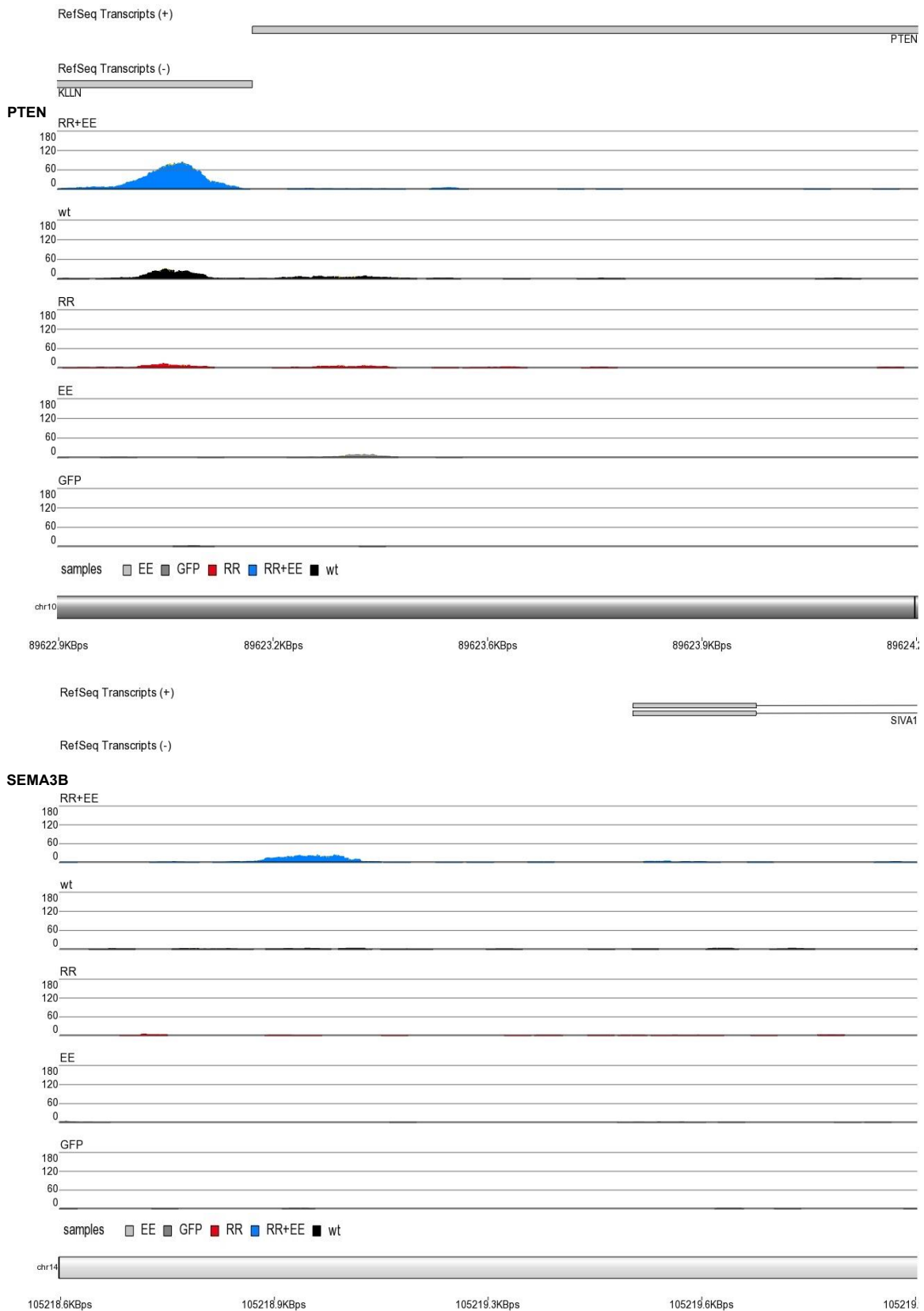


Fig. 6.3: BS der Apoptosegene PTEN und SEMA3B im Partek Genome Browser. Peaks von Wildtyp-p53 (schwarz), sowie der p53-Mutanten RR+EE (blau), RR (rot), EE (grau) und der Negativkontrolle GFP (dunkelgrau). Aufgetragen sind die Anzahl der jeweils angereicherten Sequenzen (Maximum 180).

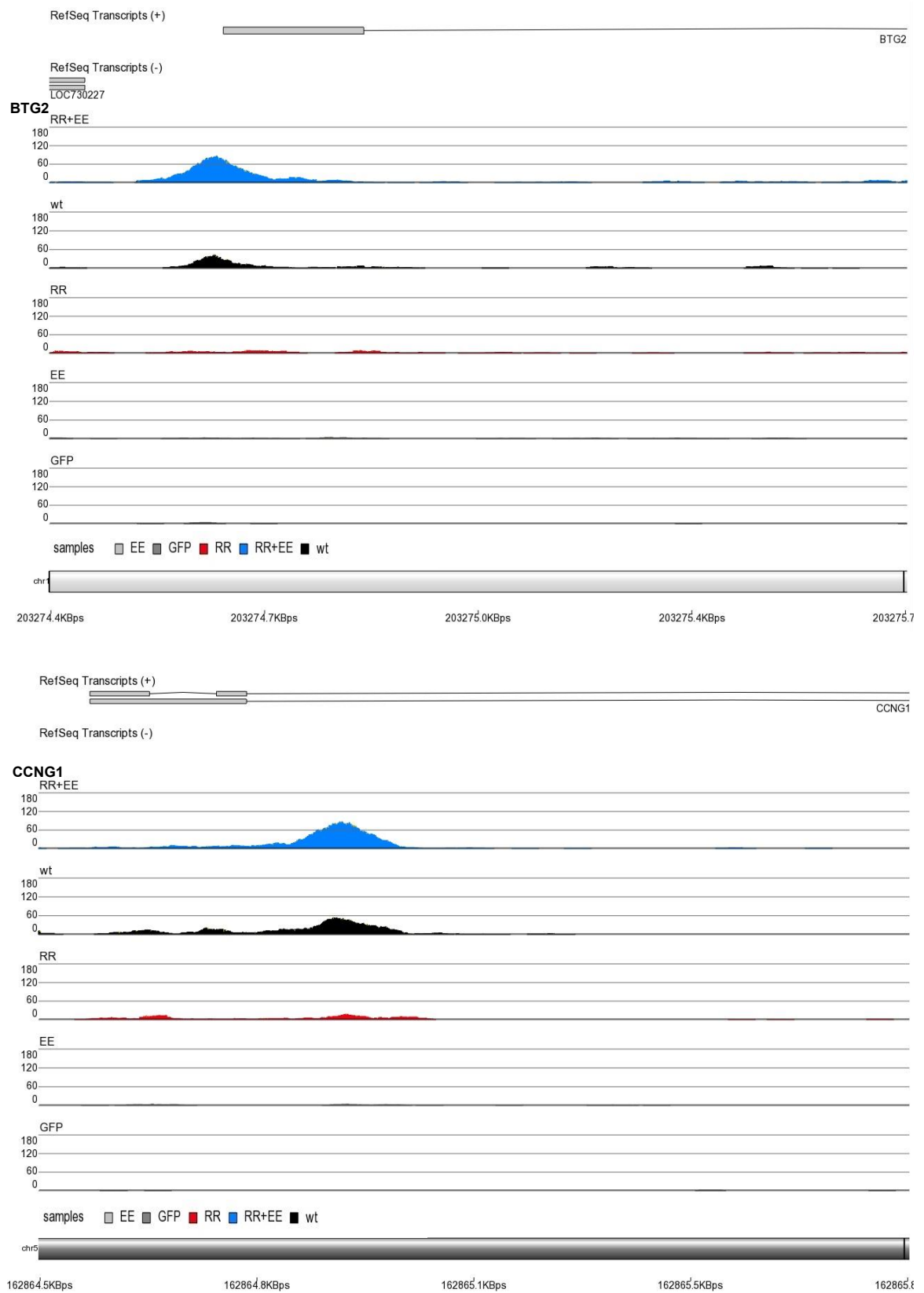


Fig. 6.4: BS der Zellzyklusarrestgene BTG2 und CCNG1 im Partek Genome Browser. Peaks von Wildtyp-p53 (schwarz), sowie der p53-Mutanten RR+EE (blau), RR (rot), EE (grau) und der Negativkontrolle GFP (dunkelgrau). Aufgetragen sind die Anzahl der jeweils angereicherten Sequenzen (Maximum 180).

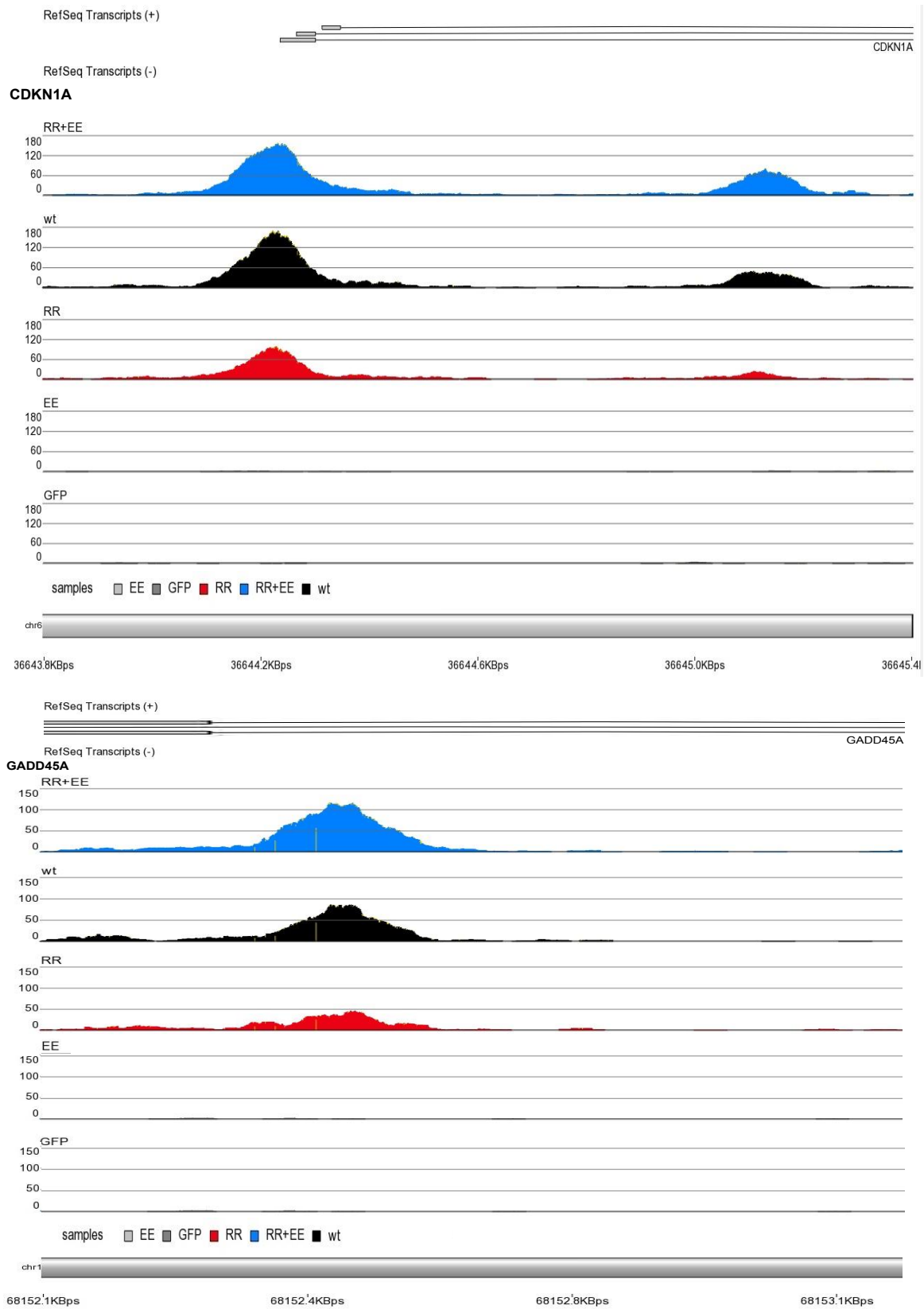


Fig. 6.5: BS der Zellzyklusarrestgene CDKN1A sowie GADD45A im Partek Genome Browser. Peaks von Wildtyp-p53 (schwarz), sowie der p53-Mutanten RR+EE (blau), RR (rot), EE (grau) und der Negativkontrolle GFP (dunkelgrau). Aufgetragen sind die Anzahl der jeweils angereicherten Sequenzen (Maximum 180 für CDKN1A und 150 für GADD45A).

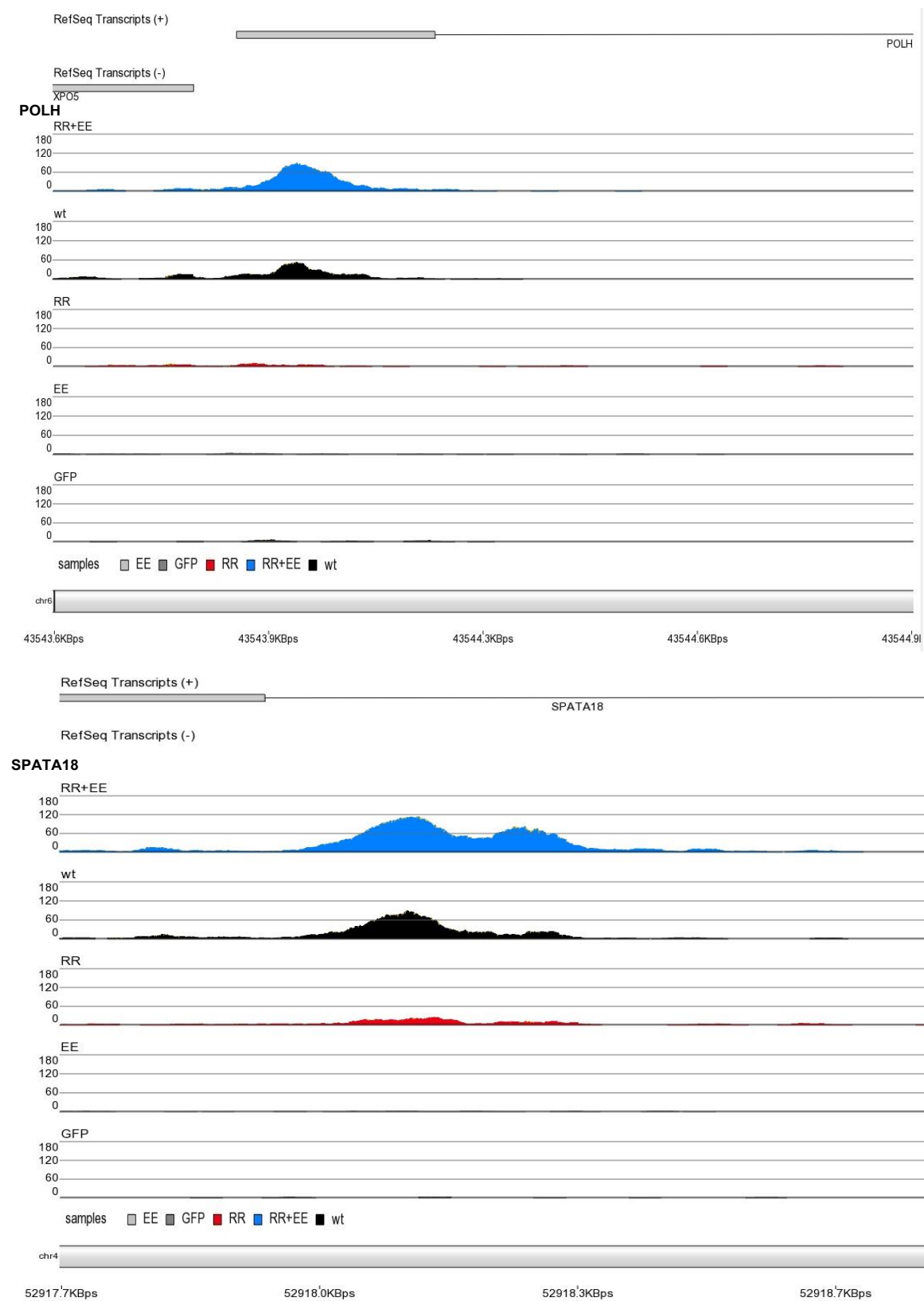


Fig. 6.6: BS der Reparaturgene POLH und SPATA18 im Partek Genome Browser. Peaks von Wildtyp-p53 (schwarz), sowie der p53-Mutanten RR+EE (blau), RR (rot), EE (grau) und der Negativkontrolle GFP (dunkelgrau). Aufgetragen sind die Anzahl der jeweils angereicherten Sequenzen (Maximum 180).

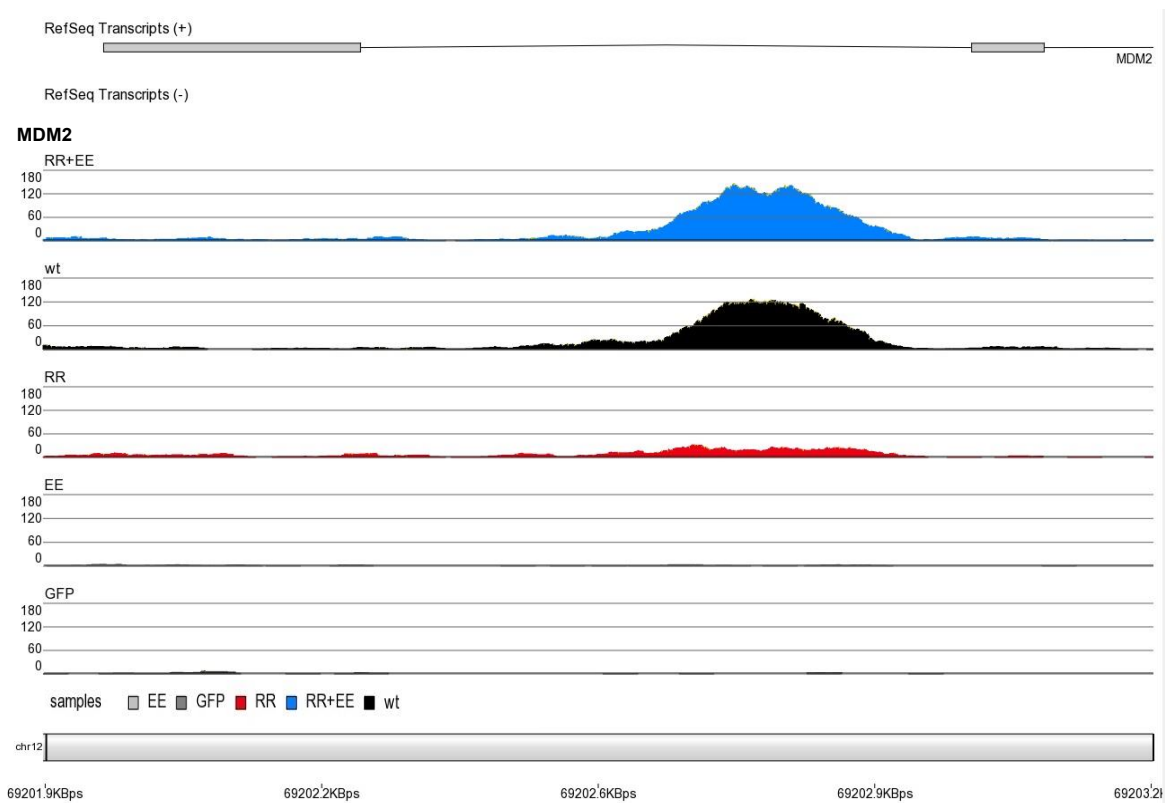


Fig. 6.7: BS von MDM2 im Partek Genome Browser. Peaks von Wildtyp-p53 (schwarz), sowie der p53-Mutanten RR+EE (blau), RR (rot), EE (grau) und der Negativkontrolle GFP (dunkelgrau). Aufgetragen sind die Anzahl der jeweils angereicherten Sequenzen (Maximum 180).

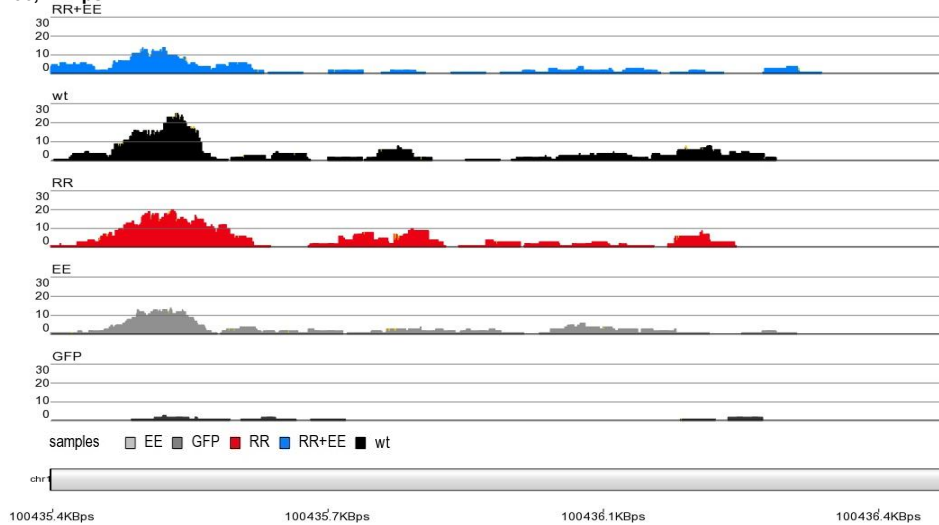
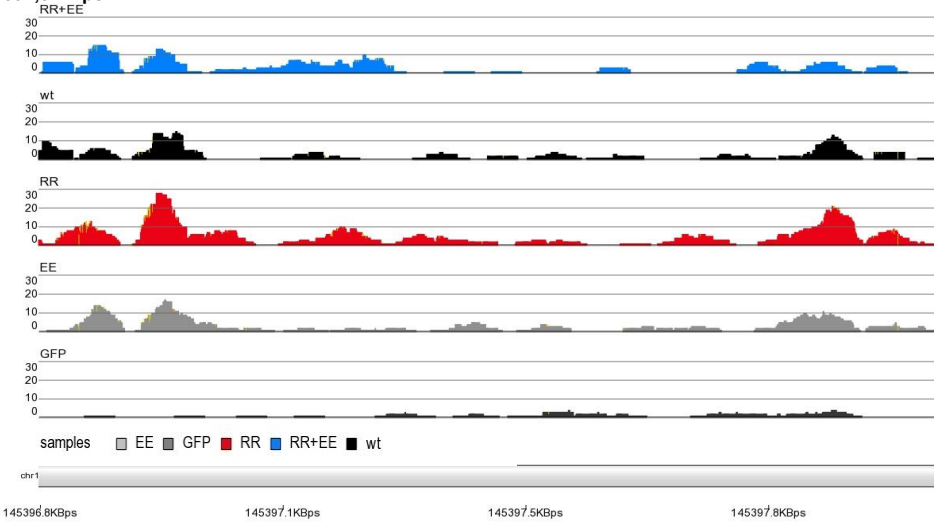
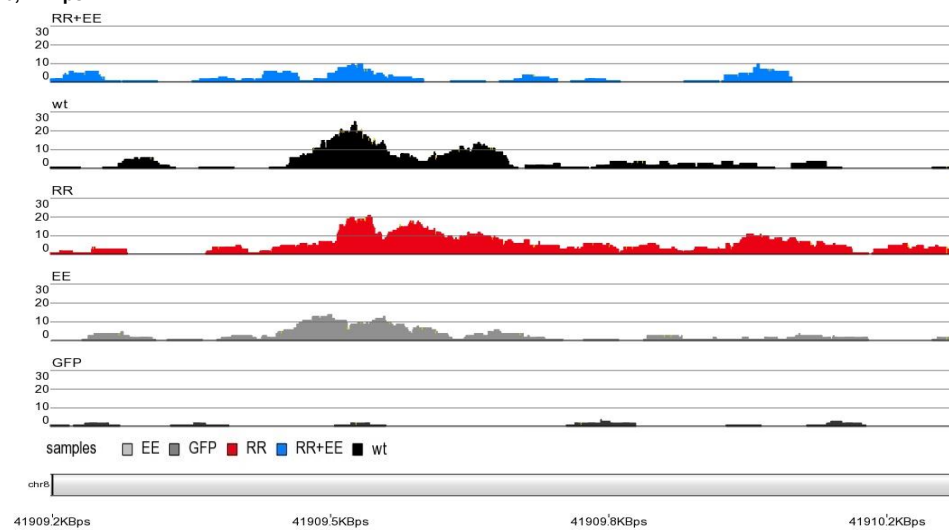
Chr 1; 100435,4 - 100436,4 KBps**Chr 1; 145396,8 - 145397,8 KBps****Chr 8; 41909,2-40910,2 KBps**

Fig. 6.8: Bereiche mit unspezifischer Anreicherung im Partek Genome Browser. Peaks von Wildtyp-p53 (schwarz), sowie der p53-Mutanten RR+EE (blau), RR (rot), EE (grau) und der Negativkontrolle GFP (dunkelgrau). Aufgetragen sind die Anzahl der jeweils angereicherten Sequenzen (Maximum 30).

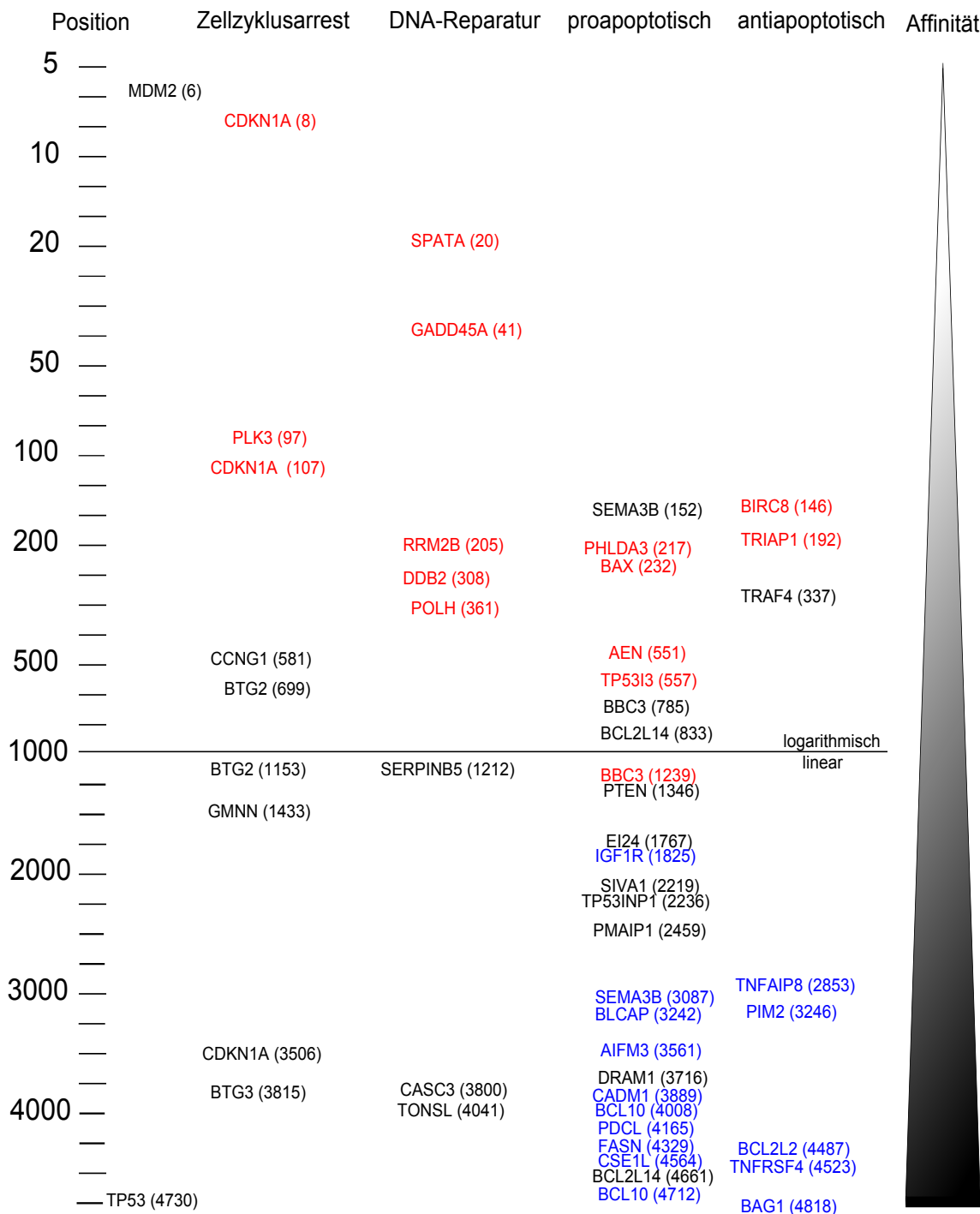


Fig. 6.9: Darstellung wichtiger regulatorischer Apoptose- und Zellzyklusarrestgene unter Ergänzung der Gennamen, angeordnet anhand der Position in der nach absteigender RR+EE-Sequenzanzahl/BS geordneten Liste. In Klammern die genaue Position der dem Gen zugehörigen BS. Einordnung in Kooperativitätsgruppen, wie folgt: Gene, die durch RR+EE, wt und RR gebunden werden (rot), Gene die durch RR+EE und wt gebunden werden (schwarz), sowie Gene, die ausschließlich durch RR+EE gebunden werden (blau). Rechts die Affinität der dem Gen zugehörigen BS.

6.2 Abkürzungen

A	DNA-Base Adenin/Ampere
Abb.	Abbildung
Ad.	Adenovirus
APO	Apolipoprotein
APS	Adenosinphosphosulfat
ARF	ADP-ribosylation factor
AS	Aminosäure
AUC	area under the curve
BAX	BCL2-associated X protein
BBC	BCL2 binding component
BCL	B-cell CLL/lymphoma
bp	Basenpaare
BS	Bindungsstelle
BSA	bovine serum albumin
C	DNA-Base Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CDK	cyklin dependent kinase
CDKN	cyclin-dependent kinase inhibitor
cDNA	complementary DNA
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
ChIPseq	Chromatin-Immunopräzipitation mit Sequenzierung
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Ct	Cycle of threshold
C-Terminus	Carboxyterminus
Da	Dalton
DBD	DNA-Bindungsdomäne
dd	doppelt destilliert
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
E	AS Glutamat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EE	p53-Mutante[R181E]

EGTA	Ethylenglykol-bis-(aminoethylether)tetraessigsäure
et al.	und andere
FCS	fetal calf serum
FPR	false positive rate
G	DNA-Base Guanin
g	Gramm / Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GATHER	Gene Annotation Toll to Help Explain Relationships
GEKID	Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister e.V.
GFP	green fluorescent protein
GO	gene ontology
GSEA	Gene Set Enrichment Analysis
h	Stunde(n)
HCl	Chlorwasserstoff
HRAS	Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
H ₂ O	Wasser
IARC	international agency for research on cancer
k	Kilo
KOH	Kaliumhydroxid
l	Liter
LiCl	Lithiumchlorid
LOH	loss of heterozygosity
M	molar
m	milli / Meter
μ	mikro
Mdm2	mouse double minute 2
MEME	Multiple Em for Motif Elicitation
min	Minute(n)
MMTV	mouse mammary tumor virus
MUC	Mucin
MYC	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
n	Nano
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
N-Terminus	Aminotermius
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline

PCR	polymerase chain reaction
PEI	Polyethylenim
PFA	Paraformaldehyd
PUMA	p53-upregulated modulator of apoptosis
NOXA	NADPH oxidase activator
R	AS Arginin
RE	responsives Element
RNase	Ribonuklease
ROC	Receiver Operating Characteristic
ROX	Referenz-Farbstoff
rpm	rounds per minute
RR	p53-Mutante[E180R]
s	Sekunde(n)
SAOS	Sarcoma osteogenic
SDS	sodium dodecylsulfate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SESN	Sestrin
T	DNA-Base Thymin
TAD	Transaktivierungsdomäne
Tab.	Tabelle
TE	Tris-Ethylendiamintetraessigsäure
TBS	Tris buffered saline
TBST	TBS-Tween
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TPR	true positive rate
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	Polyoxymethylenether
TP	tumor protein
UV	ultraviolett
V	Volt
vs.	versus
v/v	volume/volume
WT	Wildtyp
w/v	weight/volume
x	mal
z.B.	zum Beispiel

6.3 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Freiburg waren die Damen und Herren Agostini, Aktories, Arnold-Schmiebusch, Bartos, Behrends, Berger, Bogdan, Brand-Saberi, Brehm, Christ, Fabry, Fischer, Frankenstein, Haller, Hammer, Hein, Heinrich, Huang, Loop, Mertelsmann, Müller, Niemeier, Pfanner, Richter, Rospert, Schmidt, Schmutz, Spahn, Szabo, Thomasch, Tropschug, Weirich, Werner. Meine akademischen Lehrer in Lund waren die Damen und Herren Christensson, Fellmann, Kristensson-Hellström, Ley, Lindgren, Ljung, Nielsson-Ehle, Rippe, Valentin. Mein akademischer Lehrer in Marburg war Herr Stiewe.

6.4 Danksagung

In erster Linie danke ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Thorsten Stiewe. Zum Einen natürlich für die Betreuung dieser Arbeit, aber darüber hinaus für Deine inspirierende und ansteckende Begeisterung für ein kleines Protein. Zum Anderen für die Geduld, mit der Du den Fortgang dieser Arbeit trotz vielerlei Verzögerungen begleitet hat - unabhängig davon, ob es sich um das Praktische Jahr, Staatsexamen, Umzug nach Schweden, Berufsstart, Heirat oder Familiengründung handelte...

Weiterhin danke ich Katharina Schlereth für Einarbeitung und Hilfestellung im Labor, Geduld bei einer Vielzahl von Fragen, sowie für die unglaubliche Ausdauer, mit der Du diese Arbeit trotz Ortswechsel meiner- und Deinerseits begleitet und sehr gründlich und zügig immer wieder korrekturgelesen hast. Danke - Deine Hilfe lässt sich in Schokolade nicht aufwiegen! ;) Vielen herzlichen Dank an Florian und Lukas für die bioinformatischen Auswertungen - ohne Euch wäre ich manches Mal sehr verzweifelt. Danke auch an meine Arbeitsgruppe - Andrea, Anita, Anna, Anna-Maria, Anne, Antje, Claudia, Corinna, Elisabeth, Fotini, Heidi, Jan, Jonas, Jeannette, Joël, Katha, Katrin, Marie, Michael, Miriam, Oleg, Lisa und Philip.

Danke an meine Eltern - Euch war es immer wichtig unsere Neugierde und das Interesse an der Wissenschaft zu wecken. Das ist Euch gelungen! Danke auch für Eure Unterstützung und Euer Zutrauen, diese Promotion anzugehen - mal ganz abgesehen von der Finanzierung des Ganzen. Danke auch an meine Großeltern, die sich ebenfalls an der Finanzierung von Studium und Promotion beteiligt haben und mit 80 Jahren immer noch interessiert gewesen sind zu verstehen, worüber ich da eigentlich promoviere. Wer weiß, ob ich mich ohne Euch an das Verfassen dieser Arbeit in LaTeX gemacht hätte... Ich hoffe sehr, im hohen Alter noch genauso geistig rege zu sein!

Und schließlich ein DANKE an meine Familie. Unserer Tochter Linnéa dafür, dass Du mich irgendwann nachts genug hast schlafen lassen um mich während Deines Mittagsschlafs an das Beenden dieser Arbeit setzen zu können. Und natürlich an Christoph, der im Laufe dieser Promotion von meinem Freund zu meinem Verlobten, schließlich zu meinem Mann und zum Vater unserer Tochter wurde. Ohne Dich, Deinen Zuspruch, Dein Zuhören und Dein Zutrauen hätte ich diese Arbeit weder begonnen noch beendet!

6.5 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

„Genomweite funktionelle Analyse von p53-Bindungsstellen via ChIPseq“
an der Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Immunologie, unter Leitung von Prof. Dr. Thorsten Stiewe ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Teile der Arbeit wurden in folgender Publikation veröffentlicht:

SCHLERETH K, HEYL C, KRAMPITZ AM, MERNBERGER M, FINKERNAGEL F, SCHARFE M, JAREK M, LEICH E, ROSENWALD A, STIEWE T. Characterization of the p53 Cistrome - DNA Binding Cooperativity Dissects p53's Tumor Suppressor Functions. PLoS Genet. 2013;9(8)

Lund, den

Charlotte Heyl